

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA A CINOMOSE CANINA,
COM ÊNFASE NAS ALTERAÇÕES OCULARES

CURITIBA

2010

FLÁVIA BIANCA PEREIRA

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO PARA A CINOMOSE CANINA,
COM ÊNFASE NAS ALTERAÇÕES OCULARES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação da Universidade Federal do Paraná
para a obtenção do título de Mestre.
Orientador: Prof. Dr. Fabiano Montiani-Ferreira

CURITIBA

2010

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS




PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **“ESTUDO COMPARATIVO ENTRE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA CINOMOSE CANINA, COM ÊNFASE NAS ALTERAÇÕES OCULARES”** apresentada pela ~~mostranda~~ **FLÁVIA BIANCA PEREIRA**, declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou a candidata APTA para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 31 de março de 2010


Professor Dr. Fabiano Montiani Ferreira
Presidente/Orientador


Professor Dr. Peterson Triches Dornbusch
Membro


Dra. Heloisa Helena Abil Russ
Membro

Dedico essa dissertação aos animais, eles despertaram o meu amor desde os primeiros passos que dei nesta vida. Sempre foram o centro da minha vida, responsáveis pelo meu equilíbrio e pela minha felicidade. Silenciosamente ao meu lado em todos os momentos da elaboração desta dissertação, com olhares que somente quem os ama compreende...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela caminhada feliz ao longo da estrada da vida, com curvas e obstáculos sim, mas sempre superados!

Agradeço ao meu Orientador, Prof^o Fabiano Montiani-Ferreira, por aceitar me orientar, conduzindo com sabedoria os ensinamentos para a elaboração desta dissertação. Agradeço a paciência para esclarecer as minhas dúvidas!

Agradeço a Dra. Cybelle de Souza, responsável pelo primeiro contato com o meu Orientador.

Agradeço a Dra. Ivanete Kotait, ao Biólogo José Domingues Ramos Filho, a Bióloga Ana Paula Camargo Martins, ao mestrando Eduardo Perlmann, ao mestrando Leandro Lima e ao Prof^o Renato Silva de Souza, pela imensa colaboração na realização do experimento.

Agradeço aos estagiários e veterinários da Clínica Veterinária da Sociedade Protetora dos Animais de Curitiba, pelo auxílio prestado.

Agradeço a minha querida amiga Soraia Simon, por esclarecer as minhas dúvidas nas traduções e por ouvir minhas lamentações.

Agradeço aos meus amigos e familiares, pelo entusiasmo com que reagiram a esta conquista profissional.

Agradeço aos meus pais pelo apoio e compreensão em todos os momentos, principalmente pela preocupação da minha mãe com a minha saúde durante o mestrado.

Agradeço, aos meus adorados cães Abby, Crystal, Snoopy, Susi, Puppy e Zezinho, pelo amor incondicional que me confortou nas horas difíceis.

Circo. Um lugar em que cavalos, pôneis e elefantes podem assistir a homens,
mulheres e crianças bancando os idiotas.

The Devil's Dictionary

Ambrose Bierce

(1881 – 1911)

RESUMO

A cinomose canina é causada por um morbilivírus, da família *Paramyxoviridae*, que afeta cães domésticos e carnívoros silvestres. É uma doença multissistêmica, contagiosa, com alta mortalidade, principalmente em cães entre dois e seis meses. É distribuída mundialmente. O diagnóstico efetivo é o anseio dos médicos veterinários, para tomarem medidas terapêuticas eficazes no tratamento dos cães com cinomose. Esta dissertação é composta por três trabalhos sobre a cinomose canina. A história da descoberta da cinomose e da vacina está descrita no primeiro artigo. O segundo artigo refere-se aos achados *post mortem* do exame histopatológico do bulbo ocular e anexos e da bexiga de cães com cinomose, onde o critério foi a procura por corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos e intranucleares, causados pela multiplicação do vírus nas células. O terceiro artigo relata a comparação entre teses auxiliares no diagnóstico da cinomose: imunoensaio cromatográfico, teste lacrimal de Schirmer, soroneutralização e hemograma. Por fim, a utilização e a comparação destas técnicas para auxiliar o médico veterinário no diagnóstico dos pacientes suspeitos de cinomose ou para o diagnóstico *post mortem* da cinomose foram os norteadores da presente dissertação.

Palavras-chave: cães, cinomose, exame histopatológico, imunoensaio cromatográfico, soroneutralização

ABSTRACTS

Canine distemper is caused by a morbilivirus from the *Paramyxoviridae* family that affects domestic dogs and wild carnivores. It is a multisystemic, contagious, high mortality disease, especially in dogs from two to six months old. It is spread worldwide. Effective diagnosis is the hope of veterinary doctors so that they can take efficient therapeutical measures on the treatment of dogs with canine distemper. This dissertation is composed of three different papers about canine distemper. The history of canine distemper and vaccine is described in the first article. The second article refers to *post mortem* findings of histopathological exams on ocular bulb and annexes, and urinary bladders of dogs with canine distemper, where the criteria was searching for intracytoplasmatic and intranuclear inclusion bodies caused by the multiplication of viruses in the cells. The third article describes the comparison among auxiliary theses in the diagnosis of canine distemper: Immunochromatographic method, Schirmer's lacrimal test, serum neutralization, and hemogram. Finally, utilization of comparison of these technics to assist veterinary doctors on the diagnosis of patients possibly infected with canine distemper, or for *post mortem* diagnosis, were the guides to this dissertation.

Keywords: dogs, canine distemper, histopathological exams, immunochromatographic method, serum neutralization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

3.1	Cassetes histológicos com as amostras para o exame histopatológico coletadas de cães, selecionados pelo imunoensaio cromatográfico para o experimento, já fixadas em formol 10% e cortadas em espessura apropriada para caber dentro dos cassetes. A- Glândula da terceira pálpebra; B- Bexiga; C-Bulbo ocular.....	27
3.2	Grupo controle de cães sem corpúsculos de inclusão do vírus da cinomose. Fotomicrografias de lâminas coradas com H&E, 400x, microscópio ótico – pareadas com a Figura 3.3. A- bexiga; B- glândula da terceira pálpebra; C- conjuntiva bulbar; D- córnea; E- retina.....	31
3.3	Grupo experimental de cães com corpúsculos de inclusão do vírus da cinomose. Fotomicrografias de lâminas coradas com H&E, 400x, microscópio ótico. A- bexiga; B- glândula da terceira pálpebra; C- conjuntiva bulbar; D- córnea; E- retina.....	32
3.4	Glândula da terceira pálpebra de cão com CCS induzida pela cinomose. Note a presença de adenite linfoplasmocitária e atrofia acinar.....	33
4.1	Realização do Teste Lacrimal de Schirmer. Note o papel milimetrado colocado no fórnice conjuntival ventro-lateral dos cães.....	50
4.2	Embalagem individual comercializada com duas tiras de papel filtro milimetrado do Teste Lacrimal de Schirmer, utilizado para diagnosticar a ceratoconjuntivite seca.....	50
4.3	Esquematização da estrutura do vírus da cinomose, com ênfase nas proteínas que constituem o vírus. Note a proteína F que é detectada pelo imunoensaio cromatográfico.....	53
4.4	Instruções de uso do <i>kit</i> comercial Anigen® utilizando a coleta de raspado de células conjuntivais. O <i>swab</i> deve ser umedecido com solução salina, então é passado na conjuntiva com movimentos circulares. Em seguida, o <i>swab</i> é colocado na solução tampão que acompanha o <i>kit</i> e agitado para que as células do <i>swab</i> sejam transferidas para a solução. Com a pipeta que acompanha o <i>kit</i> , a solução obtida é pingada vagarosamente no orifício do cassete. Quatro gotas são suficientes para realizar o imunoensaio cromatográfico.....	54
4.5	Interpretação positiva do kit comercial Anigen®. Note a presença de 2 bandas (ou faixas) rosas, uma referente ao controle (C) e a outra referente ao testes (T) positivos. Note também a diferença de intensidade das cores das faixas (T). No <i>kit</i> localizado mais acima a intensidade é mais forte que no <i>kit</i> localizado mais abaixo, mas ambos são considerados positivos.....	55
4.6	Interpretação negativa do <i>kit</i> comercial Anigen®. A linha C referente ao controle tem que se colorir de rosa para que o teste seja considerado válido. Note a ausência de coloração no espaço abaixo da linha T, referente ao teste. Quando a linha T não se colore e a linha C fica corada de rosa, o teste é considerado negativo para o CDV.....	56

4.7	Interpretação inválida do <i>kit</i> comercial Anigen®. Note que em nenhuma das duas ilustrações a linha C (controle) esta corada. Independentemente da linha T (teste) se corar ou não, se a linha C não se corar, o teste é considerado inválido para detectar o VCC.....	56
4.8	Efeito citopático do vírus da cinomose em fibroblastos de embriões de galinha, após cinco dias de incubação, na técnica de soroneutralização. Note a vacuolização no citoplasma das células infectadas.....	65
4.9	Soroneutralização negativa para o vírus da cinomose, sem efeito citopático, após cinco dias de incubação.....	66

LISTA DE TABELAS

3.1	Alterações encontradas no exame histopatológico <i>post mortem</i> do bulbo ocular e da conjuntiva bulbar de cães com cinomose.....	29
3.2	Presença de células inflamatórias (infiltrado linfocítico) nas estruturas do bulbo ocular e na conjuntiva bulbar visualizadas no exame histopatológico <i>post mortem</i> de cães com cinomose.....	30
3.3	Presença de corpúsculos de inclusão no exame histopatológico <i>post mortem</i> de cães com cinomose, selecionados através do imunoensaio cromatográfico realizado no líquido.....	30
4.1	Situações encontradas quando se pesquisa um teste diagnóstico para uma doença. Os animais podem ou não estar doentes e o resultado do teste diagnóstico pode ser positivo ou negativo. A partir destas quatro possibilidades (duas corretas e duas erradas), é possível calcular a sensibilidade, a especificidade, os valores preditivos positivo e negativo dos testes diagnósticos.....	60
4.2	Valores obtidos com o Teste Lacrimal de Schirmer realizado em cães, positivos e negativos para cinomose, testados com o imunoensaio cromatográfico.....	61
4.3	Valores do hemograma de cães dos grupos positivos e negativos ao imunoensaio cromatográfico para o CDV, analisados estatisticamente pelo teste T não pareado.....	62
4.4	Resultados dos testes de auxílio diagnóstico para a cinomose, realizados em cães de um abrigo de Curitiba – PR.....	63
4.5	Comparação dos valores obtidos nos testes de auxílio diagnóstico para a cinomose comparados ao exame histopatológico positivo para a presença de corpúsculos de inclusão (“padrão ouro”), realizados em cães de um abrigo de Curitiba – PR..	64

LISTA DE ABREVIATÖES

Ag – antígeno

CDV – vírus da cinomose canina

ELISA - *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

H&E – hematoxilina e eosina

KCS – ceratoconjuntivite seca

LCR – líquido céfalo-raquidiano (líquor)

RT-PCR - *reverse transcription – polymerase chain reaction*

SNC – sistema nervoso central

SN – soroneutralização

SRD – sem raça definida

Vpp – valores preditivos positivos

Vpn – valores preditivos negativos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	OBJETIVOS GERAIS.....	3
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
2	HISTÓRICO DA CINOMOSE – REVISÃO.....	4
2.1	History of canine distemper – a review.....	4
2.2	Introdução.....	5
2.3	Histórico da descoberta da cinomose.....	7
2.4	A descoberta do vírus da cinomose canina.....	8
2.5	O desenvolvimento da vacina para cinomose canina e estudos em animais.....	9
2.6	Considerações finais.....	13
2.7	Referências	13
3	ANÁLISE DOS ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS DO BULBO OCULAR E ANEXOS E DA BEXIGA DE CÃES COM CINOMOSE....	18
3.1	Histopathological analysis of the urinary bladder, eyeball and adnexa of dogs with canine distemper	19
3.2	Introdução.....	20
3.3	Material e Métodos.....	22
3.3.1	Local	22
3.3.2	Animais	22
3.3.3	Exames	23
3.3.3.1	Anigen® Rapid CDV Ag Test (imunoensaio cromatográfico).....	23
3.3.3.2	Exame histopatológico.....	24
3.3.3.3	Análise estatística.....	27
3.4	Resultados.....	28
3.5	Discussão.....	34
3.6	Conclusão.....	37
3.7	Referências	38
4	COMPARAÇÃO ENTRE TESTES AUXILIARES DE DIAGNÓSTICO DA CINOMOSE CANINA: IMUNOENSAIO CROMATOGRÁFICO, TESTE LACRIMAL DE SCHIRMER, SORONEUTRALIZAÇÃO E HEMOGRAMA.....	42
4.1	A comparison of ancillary diagnostic tests for canine distemper: immunochromatographic method, Schirmer's Test, serum neutralization and complete blood count.....	43
4.2	Introdução	44
4.3	Material e Métodos.....	48
4.3.1	Local	48
4.3.2	Animais	48
4.3.3	Exames	49

4.3.3.1	Teste Lacrimal de Schirmer.....	49
4.3.3.2	Anigen® Rapid CDV Ag.....	51
4.3.3.3	Hemograma.....	57
4.3.3.4	Soroneutralização.....	57
4.3.4	Análise epidemiológica e estatística dos resultados.....	59
4.4	Resultados	61
4.5	Discussão	66
4.6	Conclusões	70
4.7	Referências	70
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
6	ANEXO – Aprovação no Comitê de Ética do Setor de Ciências Agrárias da UFPR.....	78
7	VITA.....	79

1 INTRODUÇÃO

O vírus da cinomose canina (VCC) acomete grande número de cães, com maior incidência em animais jovens (2 a 6 meses de idade) ou idosos. O prognóstico da doença é reservado. A multiplicidade de sinais que podem ser observados dificulta o diagnóstico somente clínico, principalmente nos casos em que os sinais sistêmicos mais típicos e as mioclonias estão ausentes. Mais formas auxiliares de diagnóstico precoce e efetivo são constantemente buscadas pelos médicos veterinários.

As citações da existência da cinomose em cães datam do século XVI. O vírus foi descoberto por Henri Carré, em 1905. O início da experimentação em animais, o desenvolvimento de vacinas inativadas e atenuadas bem como a demonstração de corpúsculos de inclusão em cães doentes constituem o histórico da descoberta da cinomose no mundo.

Atualmente, o imunoensaio cromatográfico (Anigen® Rapid CDV Ag Test Kit, Animal Genetics, Korea) tem sido utilizado como apoio laboratorial, pois detecta o VCC em materiais biológicos como secreção ocular (conjuntiva), secreção nasal, urina, soro, líquido e plasma. A realização deste exame pode ser feita no consultório veterinário e sua interpretação é feita entre 5 e 10 minutos. O teste de imunoensaio cromatográfico foi utilizado para selecionar os cães que foram utilizados no experimento e os cães com resultado negativo foram considerados grupo controle.

O Teste Lacrimal de Schirmer avalia a produção lacrimal, mais precisamente sua porção aquosa, que se mostra alterada em cães com cinomose, caracterizando a ceratoconjuntivite seca.

A realização da soroneutralização avalia a existência de anticorpos contra a cinomose que neutralizam a existência do vírus da cinomose no soro dos cães. Diante da existência de sinais clínicos, a soroneutralização pode ser empregada como forma de diagnóstico, sendo a técnica concluída em cinco dias após a coleta do sangue do cão. Esta técnica laboratorial foi realizada nos cães selecionados para o experimento.

O cão com cinomose pode apresentar alterações hematológicas que são detectadas com a realização de hemograma. Nesta investigação foram realizados hemogramas nos cães estudados e os resultados serão demonstrados, no capítulo de técnicas de diagnóstico auxiliares a seguir.

O conhecimento dos achados histopatológicos constitui uma forma definitiva de diagnóstico *post mortem* de inúmeras doenças. Especial atenção foi dada aos corpúsculos de inclusão do VCC bem como às alterações presentes nas secções histopatológicas do bulbo ocular, conjuntiva, glândula da terceira pálpebra e bexiga. O uso da bexiga para análise justifica-se por ser um tecido de fácil acesso para colheita durante a necrópsia mesmo quando realizada por clínicos não especialistas em patologia veterinária e trata-se de um dos principais órgãos-alvo do vírus, amplamente utilizado para o diagnóstico da doença.

O conhecimento de diferentes técnicas de auxílio diagnóstico possibilita ao médico veterinário conduzir um tratamento voltado para o cão com cinomose. Neste sentido, o objetivo deste experimento foi comparar técnicas laboratoriais e avaliar quais delas constituem o melhor auxílio para embasar um diagnóstico de suspeição ou mesmo diagnóstico efetivo para a cinomose canina.

1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os achados clínicos oculares e histopatológicos da bexiga, bulbo e anexos oculares em cães testados para cinomose pela soroneutralização e pelo *kit* comercial de diagnóstico com documentação fotográfica dos possíveis achados.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e comparar os achados do teste denominado imunoensaio cromatográfico (Anigen® Rapid CDV Ag Test Kit, Animal Genetics, Korea) e da soroneutralização com resultados do Teste Lacrimal de Schirmer bem como com achados *post mortem* dos cães;
- Contribuir com a literatura demonstrando achados clínicos, laboratoriais e lesões histopatológicas em cães com o diagnóstico da cinomose, sobretudo as lesões do bulbo ocular, pois as mesmas são escassas na literatura.

2 HISTÓRICO DA CINOMOSE - REVISÃO

Resumo

A cinomose canina é uma doença multissistêmica, contagiosa, com alta mortalidade em cães e em outros carnívoros. Trata-se de uma doença infecciosa causada por um morbilivírus semelhante ao vírus do sarampo e da peste bovina. Está distribuída mundialmente. Os animais doentes freqüentemente desenvolvem sinais neurológicos. As citações da doença datam do século XVI, mas o primeiro relato foi em 1746. A doença foi levada da América do Sul para a Europa. O vírus foi descoberto por Henri Carré em 1905. Muitos estudos com animais foram realizados, demonstrando que existe a transmissão entre espécies diferentes de animais. A primeira vacina inativada foi desenvolvida por Puntoni em 1923, sendo aperfeiçoada por Laidlaw e Dunkin em 1928. As vacinas inativadas produziam baixa imunidade. Vacinas de vírus vivo atenuado foram desenvolvidas na década de 1950. Em 1948, foram demonstrados os primeiros corpúsculos de inclusão celular causados pelo vírus da cinomose. A revisão histórica da cinomose desde sua descoberta é o objetivo deste trabalho.

Palavras-chave: cinomose, Henri Carré, morbilivírus

2.1 History of canine distemper – a review

Abstract

Canine distemper is a multisystemic and contagious disease, with a high mortality rate in dogs and other carnivores. It is caused by a morbilivirus similar to the measles and bovine plague viruses. Sick animals normally develop neurological signs. Citations of the disease date from the 16th Century, but the first report was

written in 1746. The disease spread from South America to European countries. The virus was discovered by Henri Carré in 1905. Many studies with animals were performed demonstrating that the transmission among different animal species was possible. The first inactivated vaccine was developed by Puntoni in 1923, and improved by Laidlaw and Dunkin in 1928. Inactivated vaccines commonly produced low immunity. Live attenuated virus vaccines were developed in the 1950s. The first inclusion bodies caused by the canine distemper virus were demonstrated in 1948. This text aims to perform a historical overview of the literature available concerning canine distemper since its discovery.

Key words: canine distemper, Henri Carré, morbilivirus

2.2 Introdução

A cinomose é uma doença viral, multissistêmica, altamente contagiosa e grave presente em cães e outros carnívoros, sendo observada mundialmente. Os hospedeiros da cinomose são:

- Canidae* – cães, raposas, dingos, coiotes, lobos e chacais;
- Mustelidae* – furões, visões, doninhas, martas, cangambás, texugos e lontras;
- Procyonidae* – guaxinins, juparás e quatis;
- Felidae* – guepardos, leões, onças-pintadas maracajás, tigres e jaguatiricas;
- Hyaenidae* – hienas;
- Viveridae* – mangustos e civetas;
- Ursidae* – ursos e pandas (Appel, 1987).

O período de incubação segundo Scherding (2003) e Greene e Appel (2006) é de 14 dias; segundo Genelhu (2006), varia de 14 a 18 dias. A taxa de morbidade

varia de 25 a 75 % e a taxa de fatalidade/casos chega freqüentemente até a 50-90%, dependendo da cepa do vírus (Genelhu, 2006); segundo Scherding (2003), mais de 50% das infecções com VCC são subclínicas e a taxa de mortalidade pode variar de 0 a 100%, dependendo da virulência da cepa do VCC e da idade e do estado imune do hospedeiro.

No Brasil a cinomose é endêmica, sendo esporádica nos países desenvolvidos, como na América do Norte e na Europa (Martins et al, 2009)

Em Português, a origem da palavra cinomose vem do grego *kúon* ou *kunós*, que significa cão e originou “cino”, e o sufixo “ose” é um elemento utilizado para formar substantivos ou palavras que envolvem órgãos ou parte deles (Comunicação pessoal).

O vírus da cinomose é um morbilivírus da família *Paramyxoviridae*. Ele se relaciona proximamente com o vírus do sarampo e da peste bovina, também chamada de *rinderpest* (Jones et al, 2000). Os animais afetados freqüentemente desenvolvem sinais nervosos ou multissistêmicos e extremamente variáveis. A mortalidade varia muito entre as espécies. O vírus sobrevive poucas horas e por alguns dias fora do hospedeiro. Não há qualquer tratamento antiviral efetivo contra o vírus da cinomose, portanto, tratam-se os sinais clínicos (Scherding, 2003).

A revisão dos relatos antigos da cinomose, descrevendo a descoberta do agente causador, a elaboração de estudos em animais bem como o desenvolvimento das vacinas será desenvolvida no presente trabalho.

2.3 Histórico da descoberta da cinomose

Em meados do século XVI, as primeiras referências a cinomose foi o termo “*garotiko*”, como esta doença era conhecida na França. Em um livro publicado em 1560 com o título “Os animais que são bons para curar outros animais”, Beirnstien cita que, “quando um cachorro está sofrendo de *garotiko*, você pode curar usando a cauda de gambá seca e reduzida a pó, misturando com o seu alimento...”. Por volta de dois séculos depois, em 1789, o inglês William Taplin recomenda para tratar a doença na mais tenra idade “queimar lentamente folhas secas e obrigar o cão doente a respirar a fumaça espessa”, o que seria uma espécie de inalação (Wailly, 2008; Cani – Wap, 2008). William Taplin era um cirurgião que entrou na prática veterinária e escreveu sobre ela em **The Gentleman's Stable Directory**, 1791. Ele comumente adaptava alimentos para produzir cataplasmas, que eram empregadas no tratamento de feridas em animais. Um exemplo de uma de suas cataplasmas: uma mistura de pão, farinha de cevada, água mineral Goulard e banha (Clewlow, 2008).

Rikula (2008) escreveu sobre uma possível confusão entre raiva e cinomose, apesar da epidemia de cinomose ter iniciado na Europa na década de 1760.

Segundo Blancou (2008), o primeiro relato de cinomose canina ocorreu na América do Sul e foi descrita por Ulloa em 1746 no seu trabalho “Relação histórica da viagem à América Meridional”. De acordo com Charles F. Heusinger, a cinomose canina foi levada do Peru para a Espanha durante o século XVII. Em seguida foi relatada na Inglaterra, Itália (1764) e Rússia (1770). Em 1763, 900 cães morreram em um único dia em Madri.

Em 1809, Edward Jenner foi o primeiro a descrever o curso e as características da doença (Fenner et al., 1993).

Em 1815, Jenner observou que a cinomose era contagiosa entre os cães como varíola, sarampo e escarlatina entre seres humanos. Ele achou que se tratava de um vírus tipo pox e tentou a vacinação contra cinomose da maneira bem sucedida que realizou a vacinação contra varíola.

Em 1844, Karle teve sucesso na primeira transmissão experimental da doença passando secreção nasal de cães doentes nos lábios de animais sadios.

Em 1894, J.C. van der Slooten escreveu um artigo clássico sobre cinomose canina chamada na época de “*canine epizootic catarrhal fever*”. Era conhecida como uma infecção severa de cães e outros carnívoros. Este artigo contribuiu para o nosso conhecimento atual (Egberink, 2008).

O agente etiológico da doença foi somente descoberto em 1905, quando o vírus foi isolado por Henri Carré.

2.4 A descoberta do vírus da cinomose canina

O francês Henri Carré (1870 – 1938) estudou Medicina Veterinária na Escola de Alfort em Paris. A Escola de Alfort foi a segunda escola de veterinária do mundo, criada em 1766 (Phar Mécum, 2008).

Foi Carré, em 1905, que demonstrou ser a cinomose causada por um vírus, contrariando as hipóteses de que a mesma era atribuída a pasteurelas, brucelas, salmonelas ou a outros microrganismos bacterianos. As bactérias incriminadas como causadoras eram encontradas nos animais doentes. Mais tarde foi comprovado serem apenas bactérias invasoras.

Carré trabalhou no Instituto Pasteur, onde foi colaborador de Alexandre Yersin na elaboração das primeiras vacinas para peste bubônica, na década de 1890.

O doutor Carré foi contratado pelo Barão Pedro Affonso para trabalhar no Brasil em 1900, no Instituto Soroterápico Municipal no Rio de Janeiro, na Fazenda de Manguinhos. Junto com Oswaldo Cruz, diretor técnico do instituto, trabalhou para produzir vacinas contra a peste bubônica aqui no Brasil. Pouco depois, Carré regressou à França com problemas de saúde, segundo alguns, ou com receio da febre amarela, segundo outros (Phar Mécum, 2008).

Em 1937, um ano antes da sua morte, Carré descreve detalhadamente observações sobre a doença hoje denominada de encefalopatia espongiforme (Schwartz, 2008).

Em 1948, Holmes colocou o vírus no grupo dos vírus influenza, baseado nas características clínicas envolvendo infecções respiratórias. Koprowski, em 1959, e Imagawa, em 1960, classificaram o vírus da cinomose no gênero do vírus do sarampo e da rinderpest (Menlen e Hall, 2008).

2.5 O desenvolvimento da vacina para cinomose canina e estudos em animais

A primeira vacina contra cinomose foi criada, em 1923, pelo italiano Puntoni. A vacina foi feita de formalina e vírus inativado, obtido de tecido de cérebro de um cão sofrendo de encefalite causada pela doença. A proteção obtida com as vacinas inativadas foi limitada, não sendo utilizada por muito tempo (Rikula, 2008).

Em 1923, o editor da revista britânica *The Field* organizou um movimento para procurar a causa e a cura da cinomose canina, solicitando fundos na Inglaterra, Canadá e Estados Unidos. Dr. Patrik Playfair Laidlaw, patologista e o Major George William Dunkin, veterinário, foram encarregados da pesquisa. A colaboração financeira durou cerca de cinco anos, e o *Field Distemper Council* foi extinto,

alegando falta de sucesso da pesquisa. Mas os resultados finais foram publicados pelo veterinário do *Kennel Club* americano Edwin Reginald Blarney no *January American Kennel Gazette* (Time, 2008).

Em 1926, a teoria de Carré foi definitivamente aceita, após os trabalhos de Laidlaw e Dunkin. Pois Carré anunciou o agente etiológico, mas não provou.

Laidlaw e Dunkin utilizaram animais que nunca haviam sido expostos ao vírus. Quando, por inoculação, eles produziram cinomose, souberam que haviam conseguido isolar o vírus (Time, 2008).

Em 1928, a vacina deles foi feita com pedaços de tecidos homogeneizados de cães infectados, filtrados para remover fragmentos de tecido e bactérias, quimicamente tratados para inativar o vírus. Eles testaram as vacinas de cães em furões e não obtiveram imunização satisfatória. Desenvolveram então, uma vacina para furões e testaram em cães. Concluíram que a vacina imunizou os animais da própria espécie da origem da vacina. Por fim, eles conseguiram obter imunidade duas semanas após a vacinação, sem sinais da doença. Mas eles descobriram que a completa imunidade somente existia em poucos animais que se recuperavam da cinomose. Do sangue de cães hiperimunizados por repetidas injeções de vacina, eles desenvolveram um soro curativo. O soro provou ser efetivo apenas na fase inicial da doença (Time, 2008; Carver & Skehel, 2008).

O método de vacinação desenvolvido recomendava duas doses de vacina Laidlaw-Dunkin, preferencialmente aos três meses de idade, seguidas 15 dias depois de uma dose de vírus vivo. Outro método simultâneo foi desenvolvido e preferido por alguns proprietários por envolver somente uma ida ao veterinário, era a inoculação de soro e vírus vivo (Time, 2008).

Em 1929, o laboratório britânico Burroughs Wellcome produziu a primeira vacina de Laidlaw-Dunkin em escala comercial. Em 1930, o Lederle Laboratories iniciou a produção nos Estados Unidos (Time, 2008; Carver e Skehel, 2008).

Nesta mesma época, o Dr. Charles Rupert Stockard, da Universidade de Cornell, inoculou 163 filhotes de cães e encontrou 93% de imunidade ao expô-los à infecção, sendo que 4% demonstraram sinais fracos da doença e somente três foram severamente afetados pela inoculação (Time, 2008).

Alguns experimentos preliminares de 1933 indicaram que o tratamento de Laidlaw-Dunkin seria efetivo para outras espécies também, como raposas cinzentas, furões, doninhas e visões (Time, 2008).

Outra vacina utilizando vírus oriundo de baço de cães previamente inoculados com o vírus da cinomose, em seguida, inativado por formol também foi criada. A mesma era usada em três doses espaçadas, a cada 15 dias. A imunidade desta versão da vacina era aceitável, mas de curta duração (Mayr et al, 1988).

Uma vacina denominada de distemperóide foi desenvolvida por um pesquisador chamado Green, através de 60 passagens em furões, modificou o vírus, permanecendo ativo para furão, tornando-se inócuo para cães, porém conservando as propriedades imunizantes. Como resultado do uso desta vacina uma imunidade com longa duração foi conferida.

Estas vacinas inativadas foram usadas com limitado sucesso, até o desenvolvimento das vacinas vivas atenuadas na década de 1950 (Appel, 1987; Rikula, 2008).

O vírus da cinomose canina foi atenuado através de passagens em ovos de galinha embrionados. A cepa Lederle foi desenvolvida por Cox e Cabasso em 1952;

a cepa Onderstepoort foi desenvolvida por Haig em 1956; a cepa Rockborn foi desenvolvida por Rockborn em 1959 (Rikula, 2008).

Cox adaptou o vírus de furão à membrana corioalantóide de embrião de galinha, preparando vacinas vivas que ofereciam ótimos resultados (Mayr et al, 1988).

Rockborn, em 1958, isolou de um caso natural, o vírus em cultura primária de rim de cão, mostrando efeito citopatogênico do mesmo. Esta descoberta propiciou melhores estudos do vírus e a possibilidade de provas de soroneutralização, bem com a preparação de vacinas modificadas e atenuadas. Rockborn desenvolveu vacinas atenuadas de vírus cultivado em histocultura de rim de cão jovem, permitindo o preparo de vacinas eficientes (Mayr et al, 1988).

Em 1948, Goss, Cole e Engel demonstraram, em esfregaços de conjuntiva e da língua corados pela hematoxilina e pela eosina, inclusões celulares de aparência homogênea e de cor vermelha brilhante. As inclusões eram de tamanhos variáveis, formatos redondos ou ovais e com contorno irregular. Estas inclusões estavam presentes no citoplasma e ocasionalmente no núcleo das células epiteliais (Goss et al, 1948).

No verão do mesmo ano de 1948, ocorreu um surto de cinomose em uma fazenda de raposas de Ontário, Canadá. Muitos cães de ranchos vizinhos haviam morrido de cinomose. O veterinário local vacinou as raposas com vírus atenuado no Ontário Veterinary College, mas as raposas ainda ficavam doentes. Nesta ocasião 80% das raposas morreram. Concluiu-se na época tratar-se de um vírus transmitido dos cães para as raposas (Kennedy, 2008).

2.6 Considerações finais

A cinomose apresenta inúmeras formas de manifestação clínica, sendo que na maioria das vezes o médico veterinário realiza um diagnóstico presuntivo, baseando-se na história de vacinações inadequadas, ausência de vacinas e possibilidade de exposição ao vírus. Os métodos de diagnóstico laboratorial existentes são demorados e onerosos. Portanto, são imprescindíveis as pesquisas e experimentos que revelem formas de diagnósticos precoces efetivos e acessíveis aos médicos veterinários.

2.7 Referências

APPEL, M.J. **Virus infections of carnivores**. New York: Elsevier, 1987, v. 1, p. 133-160.

BIRCHARD, S.J. & SCHERDING, R.G. Manual Saunders: Clínica de Pequenos Animais. In: SCHERDING, R.G. **Cinomose canina**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2003. p.117-120.

BLANCOU, J. Dog distemper: imported into Europe from South America? **História da Medicina Veterinária**, v.29, 2 ed., p. 35-41, 2004. Disponível em: <<http://www.pubmed.com.br/abstract.php?bd=pubmed&submit=y&eword=history+of+the+canine+distemper&ids=15376360>> Acesso em: 07/09/2008.

Cani – WAP. **Maladie de Carré.** Disponível em: <cani-wap.chez-alice.fr/dossiers/carre.htm> Acesso em: 05/09/2008.

CARER, R; SKEHEL, J. **Distemper and influenza at Mill Hill.** Disponível em: <www.nimr.mrc.ac.uk/millhillessays/2000/influenza.htm> Acesso em: 07/09/2008.

Cinomose. Disponível em: <http://paginas.terra.com.br/educacao/98segundo/materialaula/outrosperiodos/matclaudio/cinomose.htm> Acesso em: 10/09/2008.

CLEWLOW, JOHN. **A review of the history of veterinary wound management.** Disponível em : <www.worldwidewounds.com/2003/july/Clewlow/Vet-History-Review.html> Acesso em : 10/09/2008.

EGERINK, H.F. Canine distemper: then and now. **Tijdschr Diergeneeskd**, v. 112, 6 ed., p. 21-314. Disponível em: <http://www.pubmed.com.Br/abstract.php?bd=pubmed&eword=canine+distemper:+THEN+AND+NOW&ids=3824353> Acesso em: 05/09/2008.

FENNER, F.J., GIBBS, E.P.J, MURPHY, F.A., ROTT, R., STUDDERT, M.J., WHITE, D. O. **Veterinary Virology**. 2. ed. London: Academic Press, 1993. p. 483-485.

GENELHU, M.S. **Anigen Rapid CDV Ag Test Kit**. Belo Horizonte, 2006. 1 bula de kit. Disponível: www.boieasy.com.br. Acesso: 15/01/2008.

GREENE, C.E. Infectious Diseases of The Dog and Cat. In: GREENE, C.E; APPEL, M.J. **Canine distemper**. 3.ed. Canada: Elsevier, 2006. cap. 3, p. 25-41.

GOSS, L.W.; COLE, C.R.; ENGEL, H. Inclusion bodies with special application to clinical diagnosis of canine distemper. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 112, p. 236-237, 1948.

Instituto Oswaldo Cruz. **Biografias – Oswaldo Cruz**. Disponível em: http://www.ivfrj.ccsdecania.ufrj.br/biografias/oswaldo_cruz.html Acesso em: 07/09/2008.

KENNEDY, A.H. Studies on neurotropic distemper of foxes. **Comparative Medicine and Veterinary Science**, n.12, p. 273-277, 1948. Disponível em:< <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1661432>> Acesso em: 05/09/2008.

MARTINS, D. B.; LOPES, S. T. A; FRANÇA, R. T. Cinomose canina – Revisão de literatura. **Acta Veterinaria Brasilica**. v. 3, n. 2 2009, p 68-76.

MAYR, A.; GUERREIRO, M. G. Virologia veterinária. In____. **Vírus da cinomose**. 3. ed. Porto Alegre: Sulina, 1988. p. 367-371.

MENLEN, V.; HALL,W.W. **Slow Virus Infections of the Nervous System: Virological, Immunological and Pathogenetic Considerations**, v. 41, p.1-25, 1978. Disponível em: <www.vir.sgmjournals.org/cgi/reprint/41/1/1.pdf> Acesso em: 10/09/2008.

PHAR – MÉCUM. **Histórico da saúde – veterinário**. Disponível em: <<http://www.phar-mecum.com.br>> Acesso em: 10/09/2008.

RIKULA, U. K. **Canine distemper in Finland – vaccination and epidemiology**. Disponível em: <<https://oa.doria.fi/bitstream/handle/10024/36062/cammei.pdf?sequence=1>> Acesso em 07/09/2008.

SCHWARTZ, M. **How the cows turned mad**. Disponível em: <www.ucpress.edu/books/pages/9838/9838.ch01.php> Acesso em: 10/09/2008.

TIME. **Scourege's end.** Disponível em:
<www.time.com/time/magazine/article/0,9171,847144,00.html> Acesso em:
10/09/2008.

WAILLY, Philippe. **La maladie de Carré. Pathologie du jeune âge.** Disponível em:
<www.educanin.ifrance.com/sante/maladie-carre.html> Acesso em: 05/09/2008.

3 ANÁLISE DOS ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS DO BULBO OCULAR E ANEXOS E DA BEXIGA DE CÃES COM CINOMOSE

Resumo

A cinomose canina é uma doença viral multissistêmica, responsável por causar alterações que podem ser evidenciadas pela realização do exame histopatológico. O exame histopatológico *post mortem* foi realizado em 46 cães, 31 do grupo experimental e 15 do grupo controle. Os cães do grupo experimental foram selecionados como positivos para cinomose através da realização do imunoensaio cromatográfico no líquido. Os cães incluídos no grupo controle foram negativos a este teste. O objetivo deste trabalho foi realizar o exame histopatológico como diagnóstico da cinomose, através da pesquisa de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos e intranucleares causados pela replicação do vírus da cinomose nas células como um sinal patognomônico. Foram coletados os bulbos oculares, seus anexos e a bexiga de cada cão. Estes materiais foram processados para a confecção de lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Os achados de corpúsculos de inclusão foram: bexiga 57%(26/46), glândula da terceira pálpebra 76%(35/46), córnea 15%(7/46), conjuntiva bulbar 11%(5/46) e retina 7%(3/46). A presença dos corpúsculos de inclusão no exame histopatológico possui valor diagnóstico para os patologistas, pois foram achados em 5 cães previamente testados como negativos ao imunoensaio cromatográfico.

Palavras-chave: exame histopatológico, corpúsculo de inclusão, cinomose canina.

3.1 Histopatological analysis of the urinary bladder, eyeball and adnexa of dogs with canine distemper

Abstract

Canine distemper is a multisystemic viral disease capable of causing several changes that can be demonstrated on the histopathological analysis. Histopathological analyses were performed in 46 dogs, 31 in dogs that tested positive for canine distemper virus on the chromatographic immunoassay (using cerebrospinal fluid) and 15 in dogs that tested negative for the test (considered control group). The goal of this work was to perform histopathological exam for the diagnosis of canine distemper considering the finding of intracytoplasmatic and intranuclear inclusion bodies caused by the replication of the canine distemper virus in the cells as a pathognomonic sign. Urinary bladders, eyeballs and adnexa of each dog were collected. These samples were routinely processed for histopathology and stained with hematoxylin and eosin. Inclusion bodies were found in all tissues examined of 36 dogs as follow: urinary bladder 57%(26/46), third eyelid gland 76%(35/46), cornea 15%(7/46), bulbar conjunctiva 11%(5/46) and retina 7%(3/46). The presence of inclusion bodies demonstrated to be of a great diagnostic value to veterinary pathologists, being found even in 5 dogs that previously tested negative on the chromatographic immunoassay exam.

Key words: histopathological exam, inclusion body, canine distemper.

3.2 Introdução

A cinomose é uma doença do cão e dos carnívoros selvagens, altamente contagiosa, provocada por um vírus, complicada por infecções bacterianas secundárias, de caráter septicêmico agudo, que determina inflamações catarrais de algumas mucosas e que, em certos casos, também provoca alterações da pele e do SNC. Trata-se de uma doença difundida por todo o mundo. Após numerosos estudos das estirpes virais, as diferenças observadas referem-se à virulência e às tendências patogênicas. O vírus é incluído na família *Paramyxoviridae*, gênero *Morbilivirus* (Beer, 1999).

A conjuntivite é um sinal clínico comum em cães com cinomose, sendo ela uma conseqüência fisiopatológica de um dos seguintes mecanismos: 1) Efeitos mediados pelo vírus durante a replicação no epitélio da conjuntiva, das glândulas lacrimais e endotélio vascular; 2) Mecanismos imunomediados celulares e humorais que acabam afetando as glândulas lacrimais e causando olho seco, por fim; 3) Infecções bacterianas secundárias que resultam em alterações estruturais e funcionais na conjuntiva (Ledbetter et al, 2009).

Clinicamente a infecção pelo vírus da cinomose produz hiperemia da conjuntiva e secreção ocular serosa, além de outros sinais sistêmicos associados ao complexo da cinomose. A análise de material obtido por meio de esfregaços conjuntivais pode revelar corpúsculos de inclusão citoplasmáticos. À medida que a doença evolui, o exsudato ocular torna-se mais abundante e mucóide. Os valores do Teste Lacrimal de Schirmer diminuem, segue-se uma rinite mucopurulenta. Portanto, os cães com cinomose podem desenvolver ceratoconjuntivite seca (CCS) (Hoskins, 1997).

Cães com encefalomielite causada pelo vírus da cinomose canina (VCC) muitas vezes apresentam uma uveíte anterior branda, podendo ser clinicamente assintomática. As mais óbvias lesões oftálmicas na cinomose canina são as atribuídas aos efeitos do vírus no nervo óptico e na retina. A neurite óptica pode ser caracterizada por início repentino como a cegueira, com dilatação não responsiva das pupilas. A coriorretinite, também possivelmente presente, pode produzir um aspecto irregular de coloração cinza para o rosa na área tapetal e também na área não tapetal. Pode ainda ocorrer descolamento parcial ou completo da retina devido ao exsudato da coriorretinite. As lesões crônicas e incapacitantes do fundo do olho são associadas com atrofia de retina secundária a coriorretinite. As lesões circunscritas da retina, áreas muito reflexivas são chamadas de “lesões em medalhão de ouro” e são consideradas características que uma infecção da cinomose canina pode ter ocorrido (Greene e Appel, 2006).

O estudo realizado por Brito et al (2007), evidencia significativas alterações causadas pelo VCC em consequência da ceratoconjuntivite seca. As alterações observadas na glândula da terceira pálpebra destes cães foram atrofia glandular, obstrução e exsudação inflamatória que é a principal causa de CCS secundária a cinomose. Um mecanismo autoimune está envolvido na progressão da degeneração do tecido. O lúme do ducto lacrimal e a membrana do epitélio acinar são considerados como locais de imunidade privilegiada, normalmente protegidos por uma barreira entre o sangue e a lágrima. O vírus da cinomose pode provocar alterações na barreira entre sangue e lágrima induzindo uma injúria tecidual da glândula e, conseqüentemente, causam uma resposta inflamatória com perda de

função (Shabo et al, 1973). Este mecanismo pode estar envolvido na gênese do processo inflamatório do olho seco em cães com cinomose.

Um aumento na fibrose do tecido interacinar e uma adenite crônica multifocal caracterizada por atrofia acinar, são alterações histopatológicas comuns nas glândulas lacrimais e na glândula da terceira pálpebra em cães com olho seco (Izci et al, 2002).

A inclusão da análise histopatológica de fragmentos da bexiga no presente experimento se baseia na ocorrência extremamente comum de corpúsculos de inclusão neste órgão (Appel, 1987).

A descrição das alterações histopatológicas da bexiga, bulbo ocular e anexos, com ênfase dada ao achado de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos e intranucleares nas amostras, com respectiva documentação fotográfica, para o diagnóstico *post mortem* da cinomose constituem o objetivo deste experimento.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Local

Os cães utilizados neste experimento são provenientes da Sociedade Protetora dos Animais de Curitiba (SPAC), localizada em Curitiba – PR, Brasil.

3.3.2 Animais

Cães suspeitos de infecção natural pelo vírus da cinomose, com prognóstico reservado e com sinais clínicos multissistêmicos e/ou sinais neurológicos são

eutanasiados no estabelecimento de origem. Para o experimento, foram selecionados 31 cães positivos ao *kit* comercial Anigen® Rapid CDV Ag Test (imunoensaio cromatográfico) testado no líquido. Todos os animais do grupo positivos ao teste apresentavam secreção ocular. Outras alterações oculares não foram investigadas. Para servirem de controle, foram selecionados quinze cães sem sinais clínicos de cinomose e negativos ao Anigen® testado no líquido, com doenças incompatíveis à vida. Em ambos os grupos foram incluídos cães com histórico de vacinação desconhecido, machos e fêmeas, entre dois meses e 10 anos, sendo a maioria sem raça definida (SRD).

Os cães eutanasiados foram previamente submetidos à anestesia dissociativa intravenosa (xilazina 0,1 – 0,8 mg/kg e cetamina 1 – 5 mg/kg). Após o animal estar anestesiado, recebeu uma injeção intravenosa de cloreto de potássio 19,1% na dose de 70mg/kg.

3.3.3 Exames

3.3.3.1 Anigen® Rapid CDV Ag Test (imunoensaio cromatográfico)

O *kit* comercial Anigen® Rapid CDV Ag Test (imunoensaio cromatográfico) foi utilizado para selecionar os pacientes. Para tanto, empregou-se líquido destes pacientes. O *kit* comercial Anigen® é um teste ELISA modificado, importado da Coreia pela Bioeasy Diagnóstica Ltda.

O líquido foi coletado na cisterna cerebelomedular por punção com a agulha do cateter 22G, que após ser introduzido penetrava a pele e atingia o espaço subaracnóideo na medula cervical do cão. Quando a agulha atingia o líquido era

permitido o gotejamento do mesmo em um tubo de ensaio. Foi coletado 2 mL de líquido de cada cão. O líquido foi coletado com o cão anestesiado conforme previamente descrito, antes de ser realizada a eutanásia.

3.3.3.2 Exame histopatológico

Foram coletados os bulbos oculares, as glândulas da terceira pálpebra e a bexiga de 31 cães do grupo experimental e de 15 cães do grupo controle.

Os procedimentos após a coleta dos bulbos oculares foram realizadas de acordo com Montiani-Ferreira et al (2009). Logo após a enucleação, foi injetado cerca de 0,3 mL de fixador formol a 10% no corpo vítreo, por meio de uma agulha 23 G e seringa de insulina. A agulha foi inserida no aspecto temporal (lateral) do bulbo do olho, atravessando a esclera, pois esta porção é removida nos próximos passos. Com o auxílio de uma tesoura e de uma pinça dente-de-rato, foi feita a remoção dos músculos extraoculares, da gordura retrobulbar e da glândula da terceira pálpebra. Desta glândula também foram removidos os tecidos e a gordura que não foram utilizados. Em seguida, o bulbo e a glândula da terceira pálpebra foram fixados por inteiro no formol 10%. A quantidade de fixador em relação ao bulbo é de 20:1. O tempo de fixação recomendado é de 48h a 4° C na geladeira.

Após a fixação, o bulbo foi cortado ao meio com o auxílio de uma lâmina de barbear. O bulbo foi posicionado com a córnea voltada para baixo, em cima de uma lâmina de isopor. A lâmina foi colocada sob o nervo óptico em sentido perpendicular aos dois vasos sanguíneos, cursando de modo caudo-rostral na esclera e maneira bilateral (artérias ciliares posteriores longas). A lâmina foi pressionada em um só sentido, cortando-se a maior parte do bulbo. Não se pôde mover a lâmina para frente

e para trás nessa etapa. Pouco antes de chegar ao limbo, a lâmina encontrou o cristalino rígido pela fixação, ocorrendo resistência ao corte. Nessa ocasião, a lâmina foi segurada com as duas mãos e foi pressionada com mais pressão de corte para baixo. Após a passagem da lâmina pelo cristalino, toda a câmara anterior foi automaticamente cortada, por oferecer menor resistência (Montiani-Ferreira et al 2009).

Com o bulbo cortado ao meio, foi necessário criar janelas laterais para a passagem e a aderência da parafina, evitando a criação de sérios artefatos e o desabamento ou colapso de toda a estrutura do bulbo na inclusão de parafina. Com uma das metades voltadas para o isopor, foi utilizada uma lâmina de barbear para cortar exatamente a região que corresponde ao pólo desta metade do bulbo. O bulbo estava bem fixado e ligeiramente mais rígido que o normal. Restou apenas um tomo da metade do bulbo cortado, contendo as túnicas e os tecidos intra-oculares. Em seguida, o tomo ou fatia do bulbo foi colocado dentro de um cassete plástico e identificado para seguir para o procedimento histopatológico (Montiani-Ferreira et al 2009).

A glândula da terceira pálpebra, após ser fixada por 48h, foi colocada em um cassete plástico e identificada, para seguir junto com o bulbo para o processamento histopatológico.

A bexiga foi coletada inteira e fixada em formol 10% durante 48h. Em seguida, foi cortada na região central, transversalmente em todo o seu diâmetro, em cortes da largura do cassete plástico, com o auxílio de uma lâmina de barbear ou de estilete, sobre uma lâmina de isopor. Após ser colocada no cassete e identificada, seguiu para o procedimento de inclusão em parafina.

Após o acondicionamento em cassetes plásticos, as peças coletadas seguiram para processamento histotécnico de rotina, incluídas em parafina e para a montagem dos blocos. Os blocos foram cortados em fatias de 5 micrômetros. As fatias foram montadas em uma lâmina, seguiram para a coloração de hematoxilina e eosina para, em seguida, serem cobertas por uma lamínula. Após a finalização da montagem das lâminas, seguiu-se a análise com o auxílio de microscopia óptica.

As lâminas foram analisadas, anotando-se os possíveis achados histopatológicos e, particularmente, quanto à presença ou a ausência de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos ou intranucleares do vírus da cinomose. Os corpúsculos de inclusão do vírus da cinomose foram considerados como diagnóstico positivo *post mortem* do exame histopatológico. Foram feitos registros fotográficos dos corpúsculos encontrados nas lâminas do bulbo e conjuntiva bulbar, da glândula da terceira pálpebra e da bexiga.

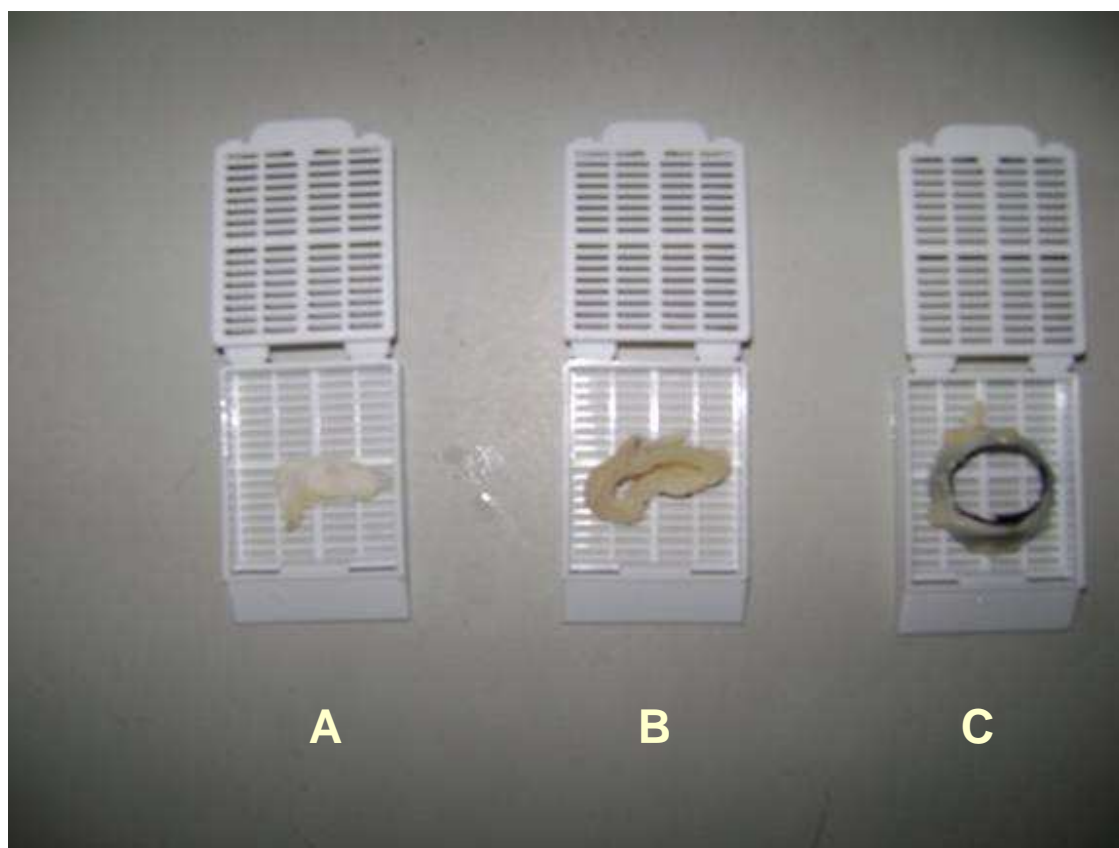


Figura 3.1 – Cassetes histológicos com as amostras para o exame histopatológico coletadas de cães, selecionados pelo imunoensaio cromatográfico para o experimento, já fixadas em formol 10% e cortadas em espessura apropriada para caber dentro dos cassetes. A- Glândula da terceira pálpebra; B- Bexiga; C- Bulbo ocular.

3.3.3.3 Análise estatística

Empregou-se o Teste Exato de Fisher para comparar se havia diferenças entre a frequência de localização ocular de infiltrados inflamatórios e entre os locais onde foram encontrados corpúsculos de inclusão. Após a análise, valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

3.4 Resultados

No exame histopatológico do bulbo ocular dos animais afetados foram observadas várias alterações na bexiga, glândula da terceira pálpebra, conjuntiva, córnea, úvea e retina (ver Tabela 3.1).

Infiltrados de células inflamatórias (linfócitos e plasmócitos) foram observadas com maior intensidade na córnea, na conjuntiva bulbar e no corpo ciliar (ver Tabela 3.2). Nas amostras de glândula da terceira pálpebra foram particularmente visualizados muitos linfócitos e plasmócitos entre os ácinos, indicando inflamação e diagnosticando adenite linfoplasmocitária, que variou de moderada a acentuada.

Foram visualizados inúmeros corpúsculos de inclusão do vírus da cinomose em amostras de bexiga, glândula de terceira pálpebra córnea, retina e conjuntiva bulbar (ver Tabela 3.3).

Nas amostras de bexiga, foram visualizadas vacuolizações do citoplasma (degeneração hidrópica) com presença de corpúsculos intracitoplasmáticos e intranucleares. Estas alterações com o citoplasma vacuolizado foram visualizadas em cinco cães.

Os locais onde mais foram encontrados corpúsculos de inclusão nos animais estudados foram bexiga e glândula da terceira pálpebra (Tabela 3.3). Os corpúsculos são achados de forma mais significativa nestes dois locais quando comparados a todos os outros tecidos ($P < 0,05$).

Nas amostras de cinco cães que haviam sido testados como negativos para o VCC utilizando o imunoensaio cromatográfico, foram achados corpúsculos de inclusão no exame histopatológico.

Tabela 3.1 – Alterações encontradas no exame histopatológico *post mortem* do bulbo ocular e da conjuntiva bulbar de cães com cinomose.

Local do achado histopatológico no bulbo ocular	Achado histopatológico	Total de cães afetados
Conjuntiva	Hemorragia	01
Conjuntiva	Metaplasia escamosa no epitélio	01
Glândula da terceira pálpebra	Adenite linfoplasmocitária	26
Glândula da terceira pálpebra	Atrofia acinar	26
Córnea	Neovascularização	01
Córnea	Metaplasia escamosa	01
Córnea	Pigmentação	01
Córnea	Áreas de afinamento epitelial da córnea	02
Córnea	Vacuolização da camada basal	02
Úvea	Neovascularização em membrana fibrovascular da íris	01
Retina	Desorganização e perda da arquitetura das camadas da retina	02
Retina	Diminuição da camada nuclear interna	06
Retina	Perda das células ganglionares com diminuição da espessura	01
Coróide	Vasos dilatados	05
Limbo	Vacuolização da camada basal	01

Tabela 3.2 – Presença de células inflamatórias (infiltrado linfocítico) nas estruturas do bulbo ocular e na conjuntiva bulbar visualizadas no exame histopatológico *post mortem* de cães com cinomose.

	Sem células	Raras	Leves	Moderadas	Severas	Total
Córnea/conjuntiva	11	9	9	1	1	31
Íris	8	18	1	2	0	31
Corpo ciliar	7	11	12	1	1	31
Coróide	28	1	2	0	0	31
Retina	29	0	1	1	0	31
Nervo óptico	31	0	0	0	0	31

Tabela 3.3 – Presença de corpúsculos de inclusão no exame histopatológico *post mortem* de cães com cinomose, selecionados através do imunoensaio cromatográfico realizado no líquido.

Órgão	Bexiga	Glândula da terceira pálpebra	Córnea	Conjuntiva Bulbar	Retina
Presença de corpúsculo de inclusão n em cães do experimento	23	31	5	4	3
Presença de corpúsculo de inclusão n em cães do controle	3	4	2	1	0
Cães positivos no líquido	31	31	31	31	31
Cães negativos no líquido	15	15	15	15	15
Total de amostras	46	46	46	46	46

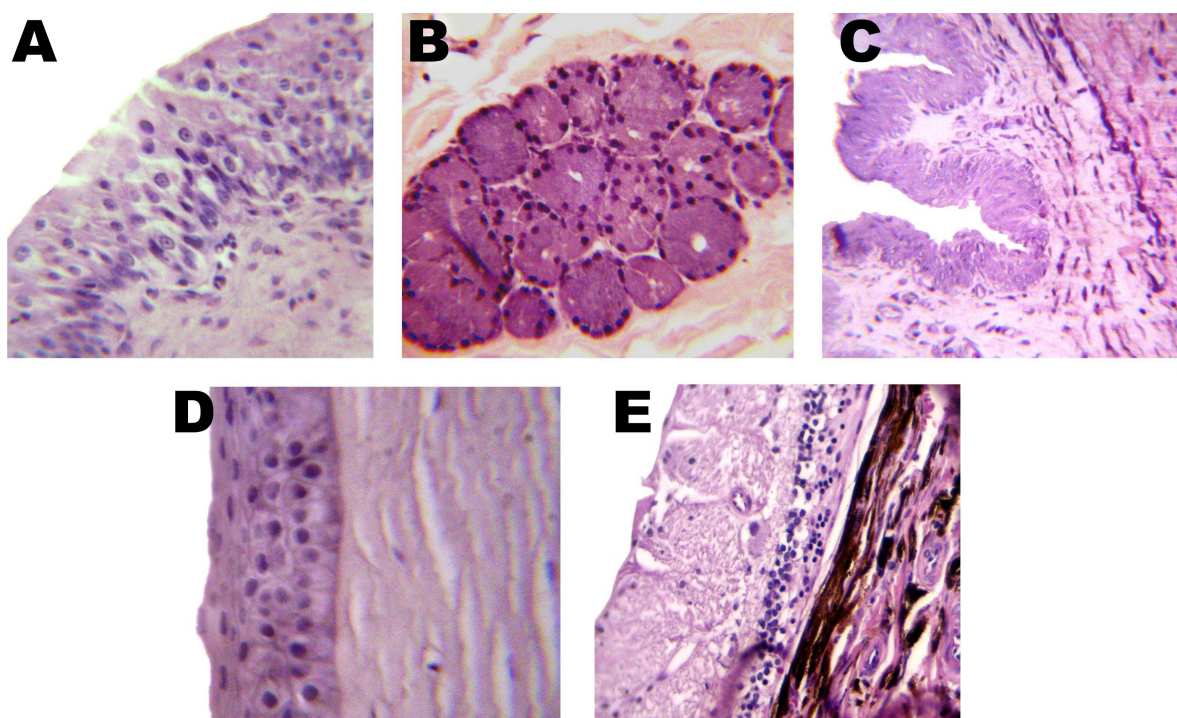


Figura 3.2 - Grupo controle de cães sem corpúsculos de inclusão do vírus da cinomose. Fotomicrografias de lâminas coradas com H&E, aumento de 400x, microscópio ótico – pareadas com a Figura 3.3. A- bexiga; B- glândula da terceira pálpebra; C- conjuntiva bulbar; D- córnea; E- retina.

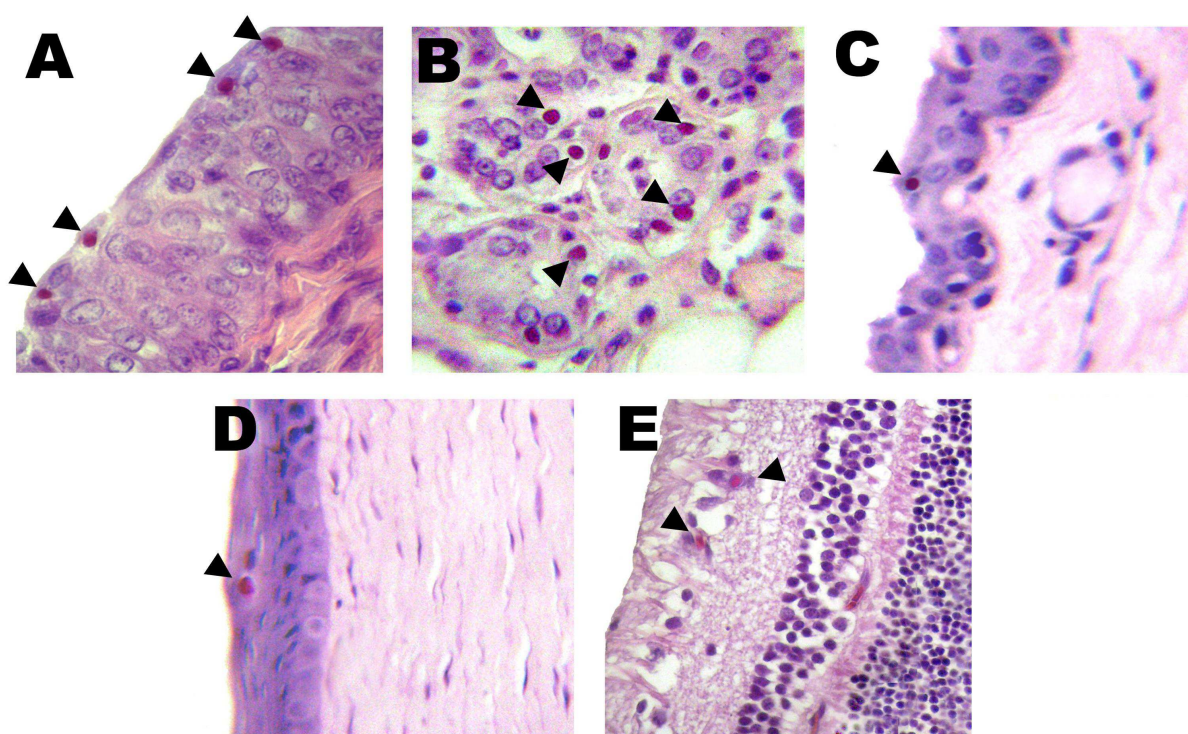


Figura 3.3 – Grupo experimental de cães com corpúsculos de inclusão do vírus da cinomose. Fotomicrografias de lâminas coradas com H&E, aumento de 400x, microscópio ótico. A- bexiga; B- glândula da terceira pálpebra; C- conjuntiva bulbar; D- córnea; E- retina.

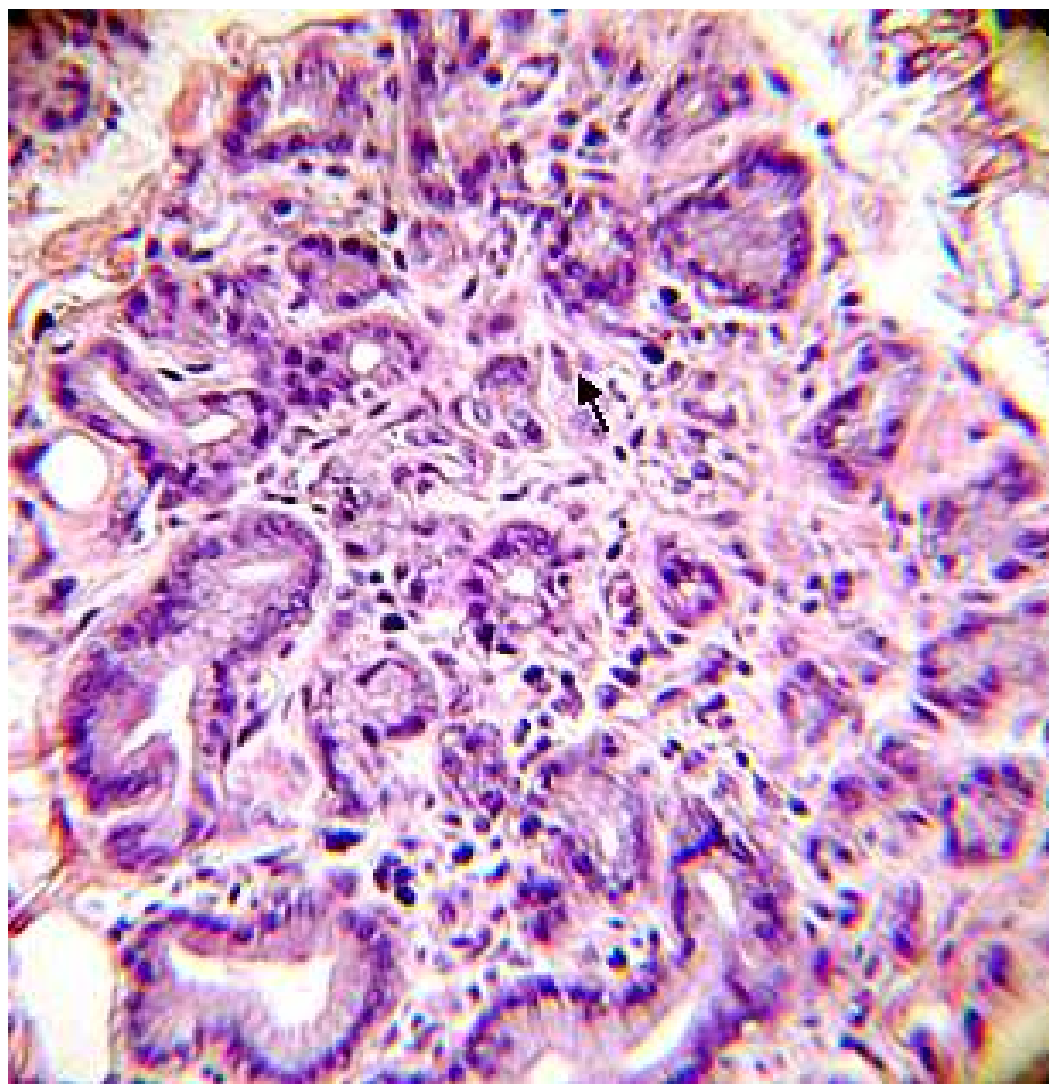


Figura 3.4 - Glândula da terceira pálpebra de cão com CCS induzida pela cinomose. Note a presença de adenite linfoplasmocitária e atrofia acinar.

3.5 Discussão

Os infiltrados linfocíticos quando encontrados na glândula da terceira pálpebra são achados oculares relacionados com cães diagnosticados com cetatoconjuntivite seca induzida pela presença do vírus da cinomose. Os infiltrados linfocíticos achados no presente trabalho concentravam-se mais comumente nos anexos oculares ou segmento anterior do bulbo ocular (córnea, íris e corpo ciliar), sendo raros na coróide, retina e nervo óptico contrariando as informações de Greene e Appel (2006) que dá muito valor ao achado de coriorretinite e neurite óptica, mas corrobora as citações de Brito et al (2007), Almeida et al (2009) e Appel (1987) que também cita a presença de infiltração de leucócitos no corpo ciliar no histopatológico de cães com cinomose.

Almeida et al (2009) encontrou 25% dos cães com corpúsculos de inclusão na conjuntiva, cujas amostras foram obtidas por meio de biópsias. No presente estudo 11% (5/46) dos cães tinham corpúsculos na conjuntiva bulbar. A diferença nos achados pode ser explicada porque foram utilizadas apenas amostras da conjuntiva bulbar, e Almeida et al (2009) não se ateve apenas à conjuntiva bulbar.

A adenite linfoplasmocitária diagnosticada nos cães do experimento é citada como uma causa primária de olho seco em cães, segundo o trabalho de Izci et al (2002).

Neste experimento, 76% (35/46) dos cães tiveram corpúsculos de inclusão detectados no exame histopatológico da glândula da terceira pálpebra, fato explicado pela origem dos cães, que eram animais abandonados em um abrigo. Ledbetter et al (2009) em seu estudo, relata que cães de rua e não castrados se contaminam

facilmente pelo contato com secreções de animais doentes. Os cães apresentaram corpúsculos na glândula da terceira pálpebra, porque é o local onde vírus se replica na fase aguda da infecção, revestida por conjuntiva.

Os achados de atrofia tubuloacinar bem como a presença de infiltrado de células monomorfonucleares, em 26 lâminas de glândulas de terceira pálpebra no presente trabalho, corroboram os achados de Brito et al (2007) que acharam a mesma alteração patológica na maioria dos cães com cinomose examinados naquele experimento.

A porcentagem de 57% (26/46) de corpúsculos de inclusão na bexiga é considerada alta se for comparada com outros estudos, sendo superada somente pelo estudo de Kubo et al (2007), que encontrou 73%. Sonne et al (2009), em seu estudo teve 27,8% dos cães examinados com corpúsculos de inclusão no epitélio da bexiga, compara com Kubo et al (2007). A diferença é atribuída à descamação observada no epitélio da bexiga, impossibilitando a visualização dos corpúsculos de inclusão no trabalho de Sonne et al (2009). Já Gebara et al (2004) encontraram apenas 15% de corpúsculos de inclusão na bexiga, alegando que a baixa porcentagem pode ter sido influenciada pelo número e pelo local dos cortes histológicos, bem como pela falta de tempo hábil para o desenvolvimento das lesões no epitélio da bexiga. Esta mesma porcentagem (15%) foi encontrada por Headley e Graça (2000) em seu experimento.

Os achados de corpúsculos na córnea foram de 15% (7/46) e na retina de 7% (3/46). Estes achados instigam a realização de um novo experimento, ampliando o

número do grupo experimental de cães com cinomose, pois constituem novos achados.

Os dois locais mais comuns de se encontrar células inflamatórias ou raras ou leves foram: córnea e conjuntiva, íris e corpo ciliar. Coróide, retina e nervo óptico foram significativamente menos comuns de se encontrar células inflamatórias.

A presença do vírus da cinomose pode ser detectada pela técnica RT-PCR (*reverse transcription – polymerase chain reaction*), considerada um método específico de diagnóstico (Amude et al, 2006). Segundo Scarpelli (2008), RT-PCR pode ter interferências e limitações. A técnica foi negativa em 34% dos animais doentes, porque 88% destes encontravam-se na fase crônica, onde o vírus está praticamente ausente. Em todos os cães saudáveis, a RT-PCR resultou positiva, provavelmente por vacinação ou doença prévia. Neste mesmo estudo, Scarpelli (2008) associou a RT-PCR com o exame histopatológico em amostras do sistema nervoso central, obtendo resultados diagnósticos satisfatórios com esta técnica. Este dado corrobora com os achados do presente experimento, onde o exame histopatológico se mostrou uma técnica sensível detectando corpúsculos em 5 cães que haviam sido testados como negativos para o VCC utilizando o imunoensaio cromatográfico

Kubo et al (2007) afirma que os exames *post mortem* para o VCC é um dos mais sensíveis métodos para confirmar infecção. A presença de corpúsculos de inclusão intranucleares e intracitoplasmáticos verificados nas amostras do presente estudo, como diagnóstico definitivo de cinomose canina, foi contestado no livro de Mayr et al (1988). O livro referencia as observações de Donovan, que evidenciou a

presença dessas inclusões em cães normais, negando, portanto, valor diagnóstico (Mayr et al, 1988). Esta contestação não é aceita pela maioria dos patologistas veterinários, que utilizam a presença de corpúsculos como “padrão ouro” para diagnosticar a cinomose em cães. Portanto, experimentos com cães saudáveis devem ser realizados para pesquisar corpúsculos de inclusão, inclusive em grupos de cães saudáveis vacinados e não vacinados, para determinar se estes corpúsculos encontrados por Donovan podem ter relação com a aplicação da vacina.

3.6 Conclusão

Concluiu-se que a avaliação pelo método imunocromatográfico deve ser quando possível associada aos achados anatomopatológicos, particularmente a presença de corpúsculos de inclusão, uma vez que os mesmos foram encontrados em cães negativos para o teste imunocromatográfico. Este achado corrobora com a citação de Kubo et al (2007), que afirma que o exame histopatológico é um dos exames mais sensíveis para o diagnóstico do VCC *post mortem*.

De acordo com o resultados obtidos no presente estudo, a glândula da terceira pálpebra tem maior valor diagnóstico para o VCC que a bexiga, considerando os achados de corpúsculos de inclusão nos exames histopatológicos *post mortem* da glândula da terceira pálpebra terem sido superiores aos achados na bexiga.

3. 7 Referências

ALMEIDA, D.E.; ROVERATTI, C.; BRITO, F.L.C.; GODOY, G.S.; DUQUE, J.C.M., BECHARA, G.H.; LAUS, J.L. Conjuntival effects of canine distemper virus-induced keratoconjunctivitis sicca. **Veterinary Ophthalmology**. v. 12, n. 4, p. 211-215, 2009.

AMUDE A.M.; ALIERI, A. A.; BALARIN, M. R. S.; REIS, A.C.F.; ALFIERI, A. F. Cerebrospinal fluid from a 7-month-old dog with seizure-like episodes. **Veterinary Clinical Pathology**. v.35, n. 1, p.119-122, 2006.

APPEL, M.J. Virus infections of carnivores. In:____. **Canine distemper virus**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1987. p. 133-159

BEER, J. Doenças infecciosas em animais domésticos. In BAUMANN, G. **Cinomose canina**. São Paulo: Roca, 1999. p. 158-164.

BRITO, F.L.C., SILVA JÚNIOR, V.A., MAIA, F.C.L., PEREIRA JÚNIOR, J.R., LAUS, J.L. Microalterações da glândula da terceira pálpebra em cães com cinomose e acometido por ceratoconjuntivite seca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 59, n. 2, p. 340-344, 2007.

GEBARA, C.M.S., WOSIACKI, S.R., NEGRÃO F.J., ALFIERI A.A., ALFIERI A. F. Lesões histopatológicas no sistema nervoso central de cães com encefalite e diagnóstico molecular da infecção pelo vírus da cinomose canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 56, n. 2, 2004.

GREENE, C.E; APPEL, M.J. **Canine distemper** In: GREENE, C.E. Infectious Diseases of The Dog and Cat. 3.ed. Canada: Elsevier, 2006. cap. 3, p. 25-41.

HEADLEY, S.A.; GRAÇA, D.L. Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 37, n. 2, 2000.

HOSKINS, J. D. **Pediatria veterinária: cães e gatos do nascimento aos seis meses**. 2 ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1997. 601 p.

IZCI, C.;CELIK, I.; ALKAN, F.; OGURTAN, Z.; CEYLAN, C. SUR, E.; OZKAN, Y. Histologic characteristics and local cellular immunity of the gland of the tired eyelid after topical ophthalmic administration of 2% cyclosporine for treatment of dogs with keratoconjunctivitis sicca. **American Journal of Veterinary Research**. v. 63, n. 5, p. 688-694, 2002.

KUBO, T., KAGAWA, Y., TANIYAMA, H., HASEGAWA, A. Distribution of Inclusion Bodies in Tissues from 100 Dogs Infected with Canine Distemper Virus. **The Journal of Veterinary Medical Science**. v. 69, n. 5, p. 527-29, 2007.

LEDBETER, E. C.; HORNBuckle, W. E. DUBOVI, E. J. Virologic survey of dogs with naturally acquired idiopathic conjunctivitis. **Small Animals – Scientific Reports**. v. 235, n. 8, 2009

MARTELLA, V.; ELIA, G.; BUONAVOGIA, C. Canine distemper virus. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**. v. 38, p. 787-797, 2008.

MONTIANI-FERREIRA, F.; WOUK, A.F.P.F; LIMA, A.S.; KLEINER, J.A.; MUZOLON, P. **Neoplasias oculares** In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. Oncologia em cães e gatos. São Paulo: Roca, 2009. Cap. 17. p. 308-310.

SCARPELLI, E. M. **Encefalomielite na cinomose canina: estudo prospectivo dos achados clínicos, histológicos e da RT-PCR**. 2008. Campinas, 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Curso de Pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.

SCHERDING, R.G. **Cinomose canina**. In: BIRCHARD, S.J. & SCHERDING, R.G. Manual Saunders: Clínica de Pequenos Animais. 2. ed. São Paulo: Roca, 2003. p.117-120.

SHABO, A.L.; KENYON, K.R.; FRANKLIN, R.M. Electron microscopic localization of a blood-tear barrier to traer protein in the primate gland. **Laboratory Investigation**. v. 28, n. 2, p.185-193, 1973.

SONNE, L.; OLIVEIRA, E.C.; PESCADOR, C.A.; SANTOS, A,S.; PAVARINI, S.P.; CARISSIMI, A.S.; DRIEMEIER , D. Achados patológicos e imuno-histoquímicos em cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 29, n. 2, 2009.

4. COMPARAÇÃO ENTRE TESTES AUXILIARES DE DIAGNÓSTICO DA CINOMOSE CANINA: IMUNOENSAIO CROMATOGRÁFICO, TESTE LACRIMAL DE SCHIRMER, SORONEUTRALIZAÇÃO E HEMOGRAMA

Resumo

Para que o médico veterinário não se atenha ao diagnóstico presuntivo, baseado nos sinais clínicos da cinomose canina, estudos para aperfeiçoar as formas de diagnóstico são realizados. Este experimento comparou técnicas simples realizadas no consultório com técnicas elaboradas realizadas em laboratório. Auxiliar o médico veterinário no diagnóstico *ante mortem* da cinomose canina, com a comparação entre alguns testes disponíveis aos médicos veterinários foi o objetivo deste experimento. Os cães foram selecionados pela realização do imunoensaio cromatográfico no líquido, pois é recomendado pelo fabricante que este material seja utilizado quando o cão está na fase crônica da doença. Em seguida, foi realizado o teste lacrimal de Schirmer e a coleta do sangue para o hemograma, para o imunoensaio cromatográfico no soro e para a soroneutralização. O grupo experimental foi constituído por 31 cães e o grupo controle por 15 cães negativos ao imunoensaio cromatográfico no líquido. Os resultados do teste lacrimal de Schirmer não foram significativos, pois os animais se encontravam desidratados, fato que influencia neste teste. Os achados dos hemogramas não foram diferentes dos encontrados na literatura, constituindo alterações leucocitárias. Os índices mais altos de especificidade e de sensibilidade foram obtidos pelo teste de imunoensaio cromatográfico no líquido, em comparação com o imunoensaio cromatográfico no soro

e com a soroneutralização, tendo como “padrão ouro” o exame histopatológico positivo para a presença de corpúsculos de inclusão do VCC.

Palavras-chave: cinomose, hemograma, teste lacrimal de Schirmer, imunoensaio cromatográfico, soroneutralização.

4.1 A comparison of ancillary diagnostic tests for canine distemper: immunochromatographic method, Schirmer's Test, serum neutralization and complete blood count

Abstract

Diagnostic tests are in constant need for improvement and validation so that veterinary doctors do not rely solely on presumptive diagnosis usually based on clinical signs of canine distemper. This investigation compared simple techniques routinely performed in the clinical office and compare to techniques performed in the laboratory. The goal of this experiment was to assist veterinary doctors on the clinical diagnosis of canine distemper with the comparison among some available tests. Dogs were selected to enter the study based on results of an immunochromatographic test using liquor of each animal. Afterwards, the Schirmer's Tear Test and blood collection for complete blood count (CBC), immunochromatographic method using serum and serum neutralization were performed. The experimental group was composed of 31 dogs and the control group of 15 dogs, positive and negative to the immunochromatographic method, respectively. The results of the Shirmer's Tear Test were not significant since the animals were severely dehydrated, which affects this

test's result. CBC findings were not different from the ones usually found in literature, such as abnormal leucocyte counts. Considering the presence of inclusion bodies from CDV as "gold standard" the highest rates of sensitivity and specificity were obtained with the immunochromatographic test using liquor, compared to the immunochromatographic method using serum and with serum neutralization.

Keywords: canine distemper, complete blood count, Schirmer's Tear Test, *immunochromatographic method*, serum neutralization.

4.2 Introdução

A cinomose é uma doença viral multissistêmica, altamente contagiosa e grave que acomete cães e outros carnívoros, sendo encontrada mundialmente. O vírus da cinomose é um morbilivírus da família *Paramyxoviridae*. A doença afeta todas as idades, mas a incidência é mais alta em filhotes entre dois a seis meses, expostos após a perda da imunidade materna. O vírus é eliminado em todas as secreções e excreções corporais. (Sherding, 2003). O período de incubação varia entre uma a quatro semanas (Scherding, 2003; Genelhu, 2006; Greene, 2006; Martella et al, 2008). A taxa de morbidade varia entre 25 a 75% (Genelhu, 2006). Já a taxa de mortalidade pode variar de zero a 100% (Scherding, 2003).

Os sinais clínicos são: anorexia, depressão, desidratação, rinite, pneumonia, tosse, dispnéia, estertores, vômito, diarreia, hipoplasia do esmalte dentário, hiperqueratose dos coxins e do nariz, dermatite pustular abdominal, osteoclerose metafisária dos ossos longos, artrite reumatóide, miocardiopatia viral, dilatação cardíaca, convulsões, marcha em círculos, alterações comportamentais, ataxia,

paresia, neuropatias periféricas e craniais, mioclonias, uveíte, neurite óptica, coriorretinite, ceratoconjuntivite seca (CCS) e úlcera de córnea (Sherding, 2003; Mendonça, 2004; Greene e Appel, 2006). Cães com lesões pustulares na pele possuem menor probabilidade de desenvolver doença neurológica, ao contrário dos cães com hiperqueratose nos coxins e no nariz. (Sellon, 2005). O tratamento deve ser de suporte e sintomático, uma vez que não existe nenhum tratamento antiviral efetivo contra o VCC (Scherding, 2003; Genelhu, 2006). O prognóstico é reservado, devido à alta mortalidade, justificando-se a eutanásia no caso de cães com sinais neurológicos progressivos severos e incapacitantes (Scherding, 2003).

O diagnóstico da cinomose é, na maioria das vezes, presuntivo e baseado na história e nos sinais clínicos do cão.

O vírus pode ser detectado em secreções, excreções e *swab* de conjuntiva (Genelhu, 2006; Martella et al, 2008). No presente experimento foram utilizados o líquido e o soro para realizar o imunoensaio cromatográfico (Anigen® Rapid CDV Ag Test Kit, Animal Genetics, Korea), pois os cães não possuíam histórico clínico por serem animais de abrigo que poderiam estar na fase aguda ou na fase crônica da doença. As recomendações do *kit* comercial são para utilizar o líquido na presença de sinais neurológicos. O *kit* comercial Anigen® é um método ELISA modificado importado pela Bioeasy Diagnóstica Ltda. Este *kit* comercial foi licenciado pelo Ministério da Agricultura em 28 de dezembro de 2006. Desde então tem sido utilizado nas clínicas e consultórios veterinários como apoio laboratorial no diagnóstico *ante mortem* do VCC.

O uso do Teste Lacrimal de Schirmer justifica-se como um instrumento auxiliar indireto para o diagnóstico *ante mortem* de cães com VCC, uma vez que se avaliará

a ocorrência de alterações na produção aquosa da lágrima nos cães positivos e negativos para o VCC.

Cães com cinomose podem apresentar alterações típicas ao hemograma. Este exame foi realizado nos cães do experimento e do controle para que as possíveis alterações fossem comparadas com as alterações clássicas citadas na literatura.

Outro método passível de ser realizado é a pesquisa de corpúsculos de inclusão, presentes em células como hemácias e leucócitos, observadas no esfregaço sanguíneo durante a realização do hemograma. Por ser encontrada na fase de viremia da cinomose, apesar da baixa frequência, esta inclusão é considerada uma ferramenta de diagnóstico precoce (Martins et al, 2009; Silva et al, 2005; Feldman et al, 2000).

As inclusões estão geralmente presentes por somente dois a nove dias após a infecção, de modo que com frequência elas não são encontradas nos esfregaços sanguíneos quando os sinais clínicos ocorrem (Lopes-Junior, 2006; Nelson e Couto, 2001; Sellon, 2005). Em função deste fato, no presente experimento, pela falta de histórico clínico e pelos sinais apresentados pelos cães quando chegaram ao abrigo, a pesquisa de corpúsculos se tornou inviável.

Títulos de anticorpos contra VCC podem ser detectados por vários meses depois da vacinação ou depois de infecções subclínicas e clínicas por soroneutralização ou imunofluorescência indireta. As imunoglobulinas M específicas ao vírus (IgM) persistem por até 3 meses depois da infecção e podem ser testadas por ELISA e usadas como referência de infecção recente por VCC (Blixenkrone-Møller et al, 1991; Von Messling et al, 1999; Martella et al, 2008). O isolamento viral

também pode ser utilizado a partir de cultura celular (Martins et al, 2009; Amude et al, 2007; Appel et al, 1992).

A presença do vírus da cinomose pode ser detectada pela técnica RT-PCR (*reverse transcription – polymerase chain reaction*), considerada um método específico de diagnóstico (Amude et al, 2006). Segundo Sellon (2005), amostras de sangue total, soro e líquido podem ser mais sensíveis para a detecção de VCC por RT-PCR do que técnicas que demonstram antígenos e anticorpos. Mas ainda é uma técnica cara para ser utilizada rotineiramente.

Devido à falta de imunocompetência, alguns cães com a forma neurológica da cinomose não desenvolvem títulos positivos no líquido (Hoskins, 1997). Cães recuperados e vacinados possuem líquido livre de anticorpos, mas cães que morreram ou que tiveram infecção persistente, com poucas exceções, apresentam anticorpos neutralizantes do VCC (Appel, 1987).

Cães que entram em contato com o vírus da cinomose desenvolvem anticorpos presentes no soro, que podem ser detectados pela técnica de soroneutralização. Esta técnica é difundida para o controle do título de anticorpos após a vacinação. A utilização desta técnica como diagnóstico de cães doentes é pouco utilizada, mas é citada no Manual Técnico de Diagnóstico Viroológico (1983). Portanto, a utilização da soroneutralização como diagnóstico de cães com cinomose foi incluída no presente experimento.

Segundo Appel (1987), anticorpos neutralizantes aparecem entre 10 a 20 dias após a infecção. Cães recuperados que sobreviveram a uma infecção virulenta por VCC, são provavelmente imunes por toda a vida. Estes cães imunes podem resistir a uma exposição ao VCC depois de sete anos de isolamento.

A comparação de técnicas laboratoriais para evidenciar a verdadeira colaboração de cada uma e as possíveis associações de técnicas no auxílio diagnóstico da cinomose canina, são os objetivos deste experimento.

4.3 Material e Métodos

4.3.1 Local

Os cães utilizados neste experimento foram provenientes da Sociedade Protetora dos Animais de Curitiba (SPAC), localizada em Curitiba – PR, Brasil.

4.3.2 Animais

Foram incluídos no grupo experimental trinta e um cães suspeitos de infecção natural pelo vírus da cinomose, com sinais clínicos e/ou neurológicos, positivos ao *kit* comercial Anigen® testados no líquido. Os cães estavam destinados à eutanásia e foram selecionados para o experimento.

O grupo controle foi constituído de quinze cães negativos ao *kit* comercial Anigen® testado no líquido, cuja eutanásia foi realizada por outras doenças incompatíveis à vida que não a cinomose.

Os cães dos dois grupos eram machos e fêmeas, com idades entre 2 meses e 10 anos, sendo a maioria SRD (sem raça definida), com histórico de vacinação desconhecido.

Os cães eutanasiados foram previamente submetidos à anestesia dissociativa intravenosa (xilazina 0,1 – 0,8 mg/kg e cetamina 1 – 5 mg/kg). Após o animal estar

anestesiado, recebeu uma injeção intravenosa de cloreto de potássio 19,1% na dose de 70 mg/kg.

4.3.3 Exames

4.3.3.1 Teste Lacrimal de Schirmer

O Teste Lacrimal de Schirmer foi realizado em 26 cães do grupo experimental e em 14 cães do grupo controle.

O Teste Lacrimal de Schirmer mediu a fase aquosa da lágrima. Foi inserida uma tira de papel filtro padrão milimetrado no fórnice conjuntival ventro-lateral e aguardado o tempo de um minuto. O resultado foi expresso na unidade mm/min. O valor normal foi considerado entre 15 e 25 mm/min. Resultados abaixo desses valores foram considerados como compatíveis com ceratoconjuntivite seca (ver Figura 4.1) ou desidratação grave.



Figura 4.1 – Realização do Teste Lacrimal de Schirmer. Note o papel milimetrado colocado no fórnice conjuntival ventro-lateral do cão.



Figura 4.2 – Embalagem individual comercializada com duas tiras de papel filtro milimetrado do Teste Lacrimal de Schirmer, utilizado para diagnosticar a ceratoconjuntivite seca. Fonte: http://www.intervetusa.com/130_163387/productdetails_130_163811.aspx.

4.3.3.2 Anigen® Rapid CDV Ag Test

O imunoensaio cromatográfico (Anigen® Rapid CDV Ag Test) foi testado no líquido como fator de inclusão dos trinta e um cães no grupo experimental e dos quinze cães no grupo controle.

Para a realização do teste foi feita a coleta de 2 mL do líquido (fluido cérebro espinhal) na cisterna cerebelomedular. A punção para a coleta foi feita com a agulha de um cateter 22G, que foi introduzida na pele até atingir o espaço subaracnóideo na espinha cervical. Assim que a agulha atingia o líquido, este gotejava em um tubo de ensaio. A coleta do líquido foi realizada com os cães anestesiados, antes da realização da eutanásia. A anestesia utilizada foi previamente descrita.

A embalagem do teste recomenda a utilização do líquido quando o cão apresenta sinais neurológicos característicos da cinomose, portanto a utilização do líquido foi padronizada para a triagem dos cães para o experimento. Resultados falsos-negativos podem ocorrer se o animal estiver na fase crônica da doença e outras amostras forem utilizadas, pois o vírus pode não estar sendo eliminado nesta fase. Muitos cães chegam na Sociedade Protetora dos Animais sem histórico clínico, pois são abandonados. Assim, na ausência de sinais neurológicos aparentes de cinomose ou sem relatos de convulsões, mas com outros sinais sugestivos, o líquido foi utilizado para o primeiro teste de triagem.

O Anigen® também foi realizado no soro coletado de 21 cães do grupo experimental e 10 cães do grupo controle. Foram coletados 2 mL de sangue da veia jugular dos cães e acondicionados em tubos de ensaio sem aditivos, para posterior separação do soro.

O procedimento para a realização do teste Anigen® com o líquido e com o soro é o mesmo. Para o procedimento do teste foi utilizada a pipeta do *kit* para adicionar 3 gotas do líquido no tubo da amostra. O dispositivo de teste foi removido da embalagem de alumínio e colocado em uma superfície plana, seca e limpa. Com a pipeta, a solução do tubo de amostra foi instilada quatro gotas, vagarosamente, no orifício do cassete.

A partir deste ponto o teste então começava a reagir. Era possível então observar uma solução de cor rosa movendo-se por ação de capilaridade no papel filtro no interior do dispositivo plástico e através de uma pequena janela era possível de se avaliar o resultado do teste. Se não fosse visualizado o resultado após um minuto, instilava-se mais uma gota. Interpretava-se após 10 minutos de espera o resultado do teste. Após 20 minutos não era mais possível realizar a interpretação do teste.

Interpretação do teste: se uma linha colorida aparecia na parte esquerda da janela (C) de resultado era indicativo de que o teste estava funcionando devidamente, sendo esta considerada linha de controle. A parte direita da janela de resultado indicava o resultado do teste (T). Se esta linha colorida aparecesse, era indicativo de um resultado positivo. A presença de somente uma linha na janela C indicava resultado negativo. Então, a presença de duas linhas coloridas (C e T), indicava um resultado positivo. A intensidade a cor das linhas poderia ser levemente diferente e isso não alterava o resultado, que ainda era considerado positivo.

Resultado inválido do teste: era considerado inválido se nenhuma linha aparecesse colorida ou se somente a linha T aparecesse colorida.

O *kit* comercial Anigen® detectou a proteína F do vírus da cinomose canina, constituinte comum a todas as cepas existentes.

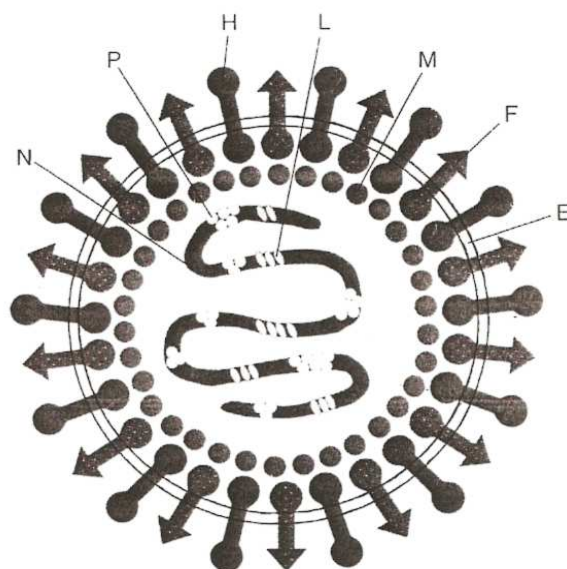


Figura 4.3 – Esquematização da estrutura do vírus da cinomose, com ênfase nas proteínas que constituem o vírus. Note a proteína F que é detectada pelo imunoensaio cromatográfico. Fonte: Greene e Appel, 2006.

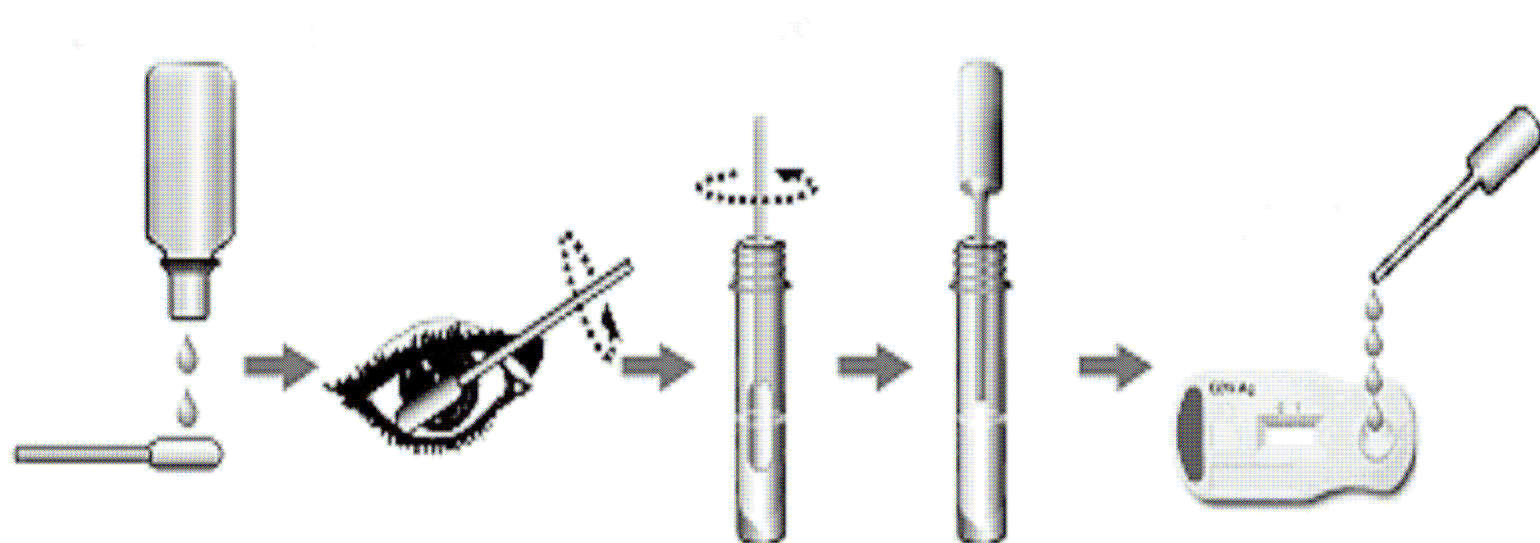


Figura 4.4 – Instruções de uso do *kit* comercial Anigen® utilizando a coleta de raspado de células conjuntivais. O *swab* deve ser umedecido com solução salina, então é passado na conjuntiva com movimentos circulares. Em seguida, o *swab* é colocado na solução tampão que acompanha o *kit* e agitado para que as células do *swab* sejam transferidas para a solução. Com a pipeta que acompanha o *kit*, a solução obtida é pingada vagarosamente no orifício do cassete. Quatro gotas são suficientes para realizar o imunoensaio cromatográfico. Fonte: <http://www.bioeasy.com.br/site/produto.php?n=118>.

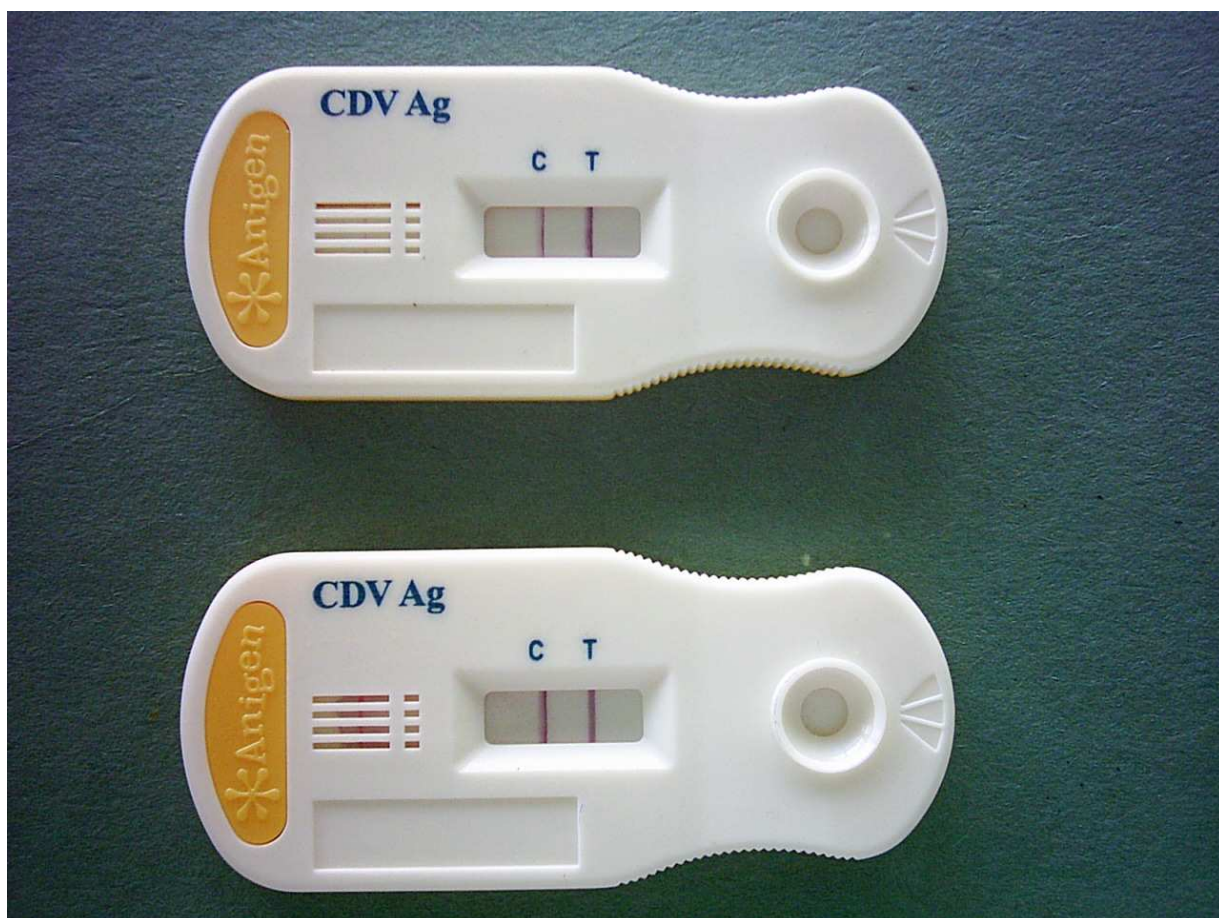


Figura 4.5 – Interpretação positiva do kit comercial Anigen®. Note a presença de 2 bandas (ou faixas) rosas, uma referente ao controle (C) e a outra referente ao testes (T) positivos. Note também a diferença de intensidade das cores das faixas (T). No *kit* localizado mais acima a intensidade é mais forte que no *kit* localizado mais abaixo, mas ambos são considerados positivos. Fonte: <http://www.bioeasy.com.br/site/produto.php?n=118>.

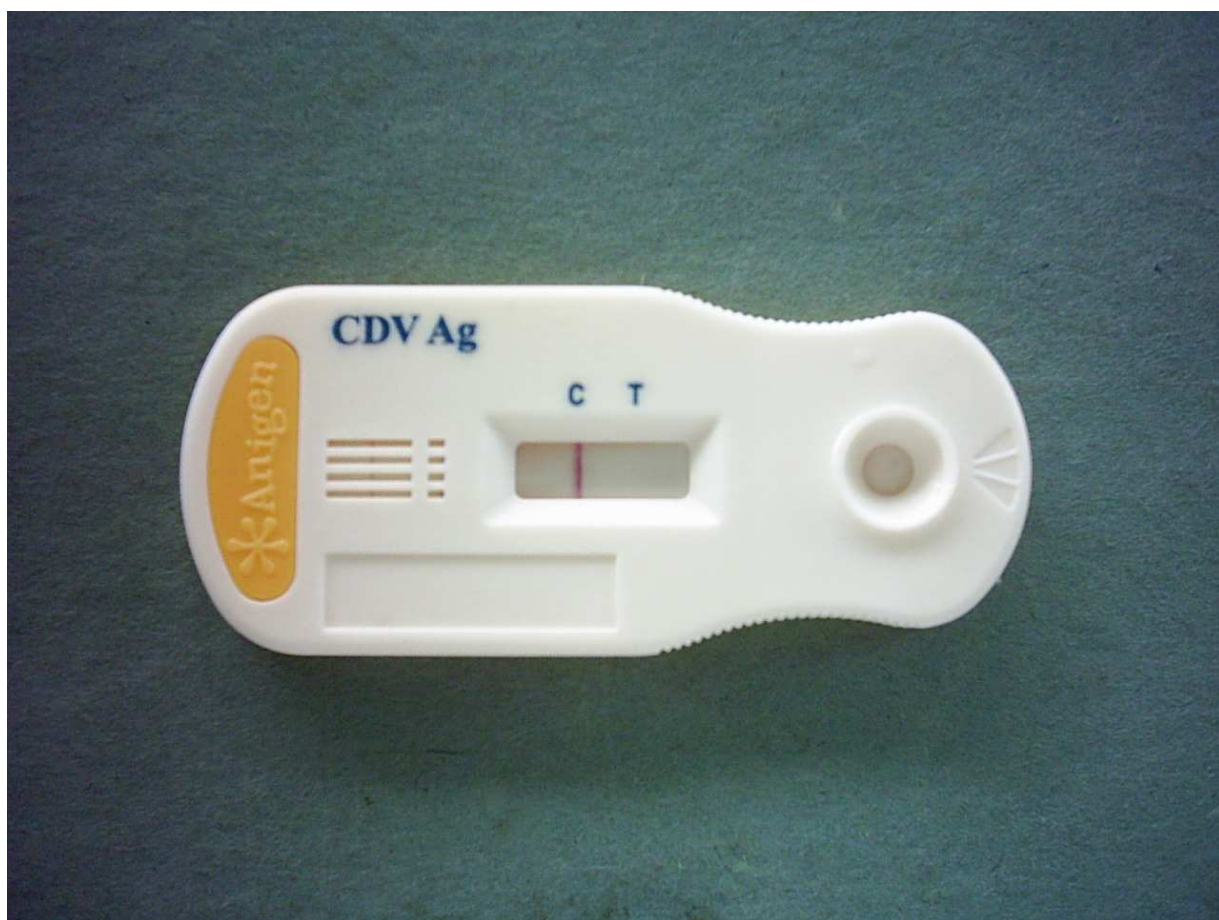


Figura 4.6 – Interpretação negativa do *kit* comercial Anigen®. A linha C referente ao controle tem que se colorir de rosa para que o teste seja considerado válido. Note a ausência de coloração no espaço abaixo da linha T, referente ao teste. Quando a linha T não se colore e a linha C fica corada de rosa, o teste é considerado negativo para o CDV. Fonte: <http://www.bioeasy.com.br/site/produto.php?n=118>.



Figura 4.7 – Interpretação inválida do *kit* comercial Anigen®. Note que em nenhuma das duas ilustrações a linha C (controle) esta corada. Independentemente da linha T (teste) se corar ou não, se a linha C não se corar, o teste é considerado inválido para detectar o CDV. Fonte: <http://www.bioeasy.com.br/site/produto.php?n=118>.

4.3.3.3 Hemograma

Foram realizados hemogramas de vinte e um cães do grupo experimental e de cinco cães do grupo controle. As amostras de 2 mL de sangue foram coletadas da veia jugular dos cães e acondicionadas em frascos contendo o anticoagulante EDTA. Os hemogramas foram realizados no Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias Preventiva, utilizando o método automatizado através do aparelho Abacus (Diatron, Viena, Áustria) Foram confeccionados esfregaços para a revisão microscópica das lâminas com a contagem manual das células sanguíneas. As lâminas dos esfregaços foram coradas com a coloração May Grünwald-Giemsa.

4.3.3.4 Soroneutralização

O teste de soroneutralização foi realizado no soro de 21 cães do grupo experimental e de 10 cães do grupo controle. Este teste foi realizado no departamento de Controle de Qualidade do Laboratório Bio-Vet S.A (Vargem Grande Paulista-SP, Brasil).

A soroneutralização é a perda da capacidade infectante do vírus, pela reação do mesmo com um anticorpo específico. Os anticorpos neutralizantes são responsáveis pelo efeito protetor do soro imune e estão dirigidos contra os antígenos específicos do vírus. Os resultados se expressam como índice soroneutralizante e representam a diferença entre o título do vírus em presença do soro controle negativo e o título do vírus em presença do soro problema (soro da amostra testada para cinomose) (Manual de técnicas de diagnóstico virológico, 1983).

A concentração de vírus utilizada foi de 100 TCID₅₀ (dose infectante em cultura de tecido). Esta concentração empregada é rotineiramente utilizada para análise de efeito citopático, utilizando o método de Reed e Muench (Freitas, 2006; Manual de técnicas de diagnóstico virológico, 1983).

As amostras de soro foram inicialmente inativadas por trinta minutos a 56° C em um termociclador. Após a inativação, 50 microlitros de soro de cada uma das amostras foram distribuídas nos primeiros pocinhos de cinco placas estéreis de 96 cavidades (pocinhos), com fundo chato. Foi utilizada uma placa somente para os soros de referência ou de controle da técnica.

Em seguida, os soros foram diluídos em meio de cultura (formulado no Laboratório Bio-Vet) contendo 1 mL de gentamicina. Com uma pipeta de oito ponteiros contendo 50 microlitros da solução de meio de cultura e gentamicina, iniciou-se a diluição no primeiro pocinho contendo o soro, seguindo a diluição de pocinho em pocinho, resultando em 12 diluições que iniciou-se em 1:2, 1:4, 1:8, etc. Após as diluições, aguardou-se tinta minutos para a gentamicina agir nas diluições.

Foram colocados 50 microlitros de suspensão viral contendo a concentração de vírus de 100 TCID₅₀ em todos os pocinhos das placas, que foram incubadas por uma hora em estufa com 3% de CO₂ a 37° C.

As placas foram retiradas cuidadosamente da estufa. O último passo da técnica foi adicionar 100 microlitros em cada pocinho da solução de concentrado de fibroblastos de embriões de galinha com oito dias, previamente preparada. As placas foram novamente incubadas na estufa com 3% de CO₂ a 37° C. A leitura dos resultados foi realizada cinco dias após a incubação, observando os pocinhos no microscópio óptico. Foi observado o efeito citopático nos fibroblastos e determinada

a diluição máxima em que este efeito ocorreu. A técnica foi considerada válida porque os soros controles não apresentaram problemas.

O padrão do Laboratório Bio-Vet para a detecção de anticorpos contra cinomose é realizado a partir da diluição de 1:16. Portanto, diluições de 1:16 e valores acima foram considerados positivos para cinomose no presente trabalho.

4.3.4 Análise epidemiológica e estatística dos resultados

As propriedades dos testes diagnósticos foram testadas utilizando os cálculos para obter a sensibilidade e a especificidade, que são características fixas destes testes. Sensibilidade é a capacidade de um teste diagnóstico dar positivo entre os portadores da doença. A especificidade é a capacidade de um teste diagnóstico dar negativo quando as pessoas não têm a doença (ver Tabela 4.1).

Foram calculados também os valores preditivos positivos (vpp) e negativos (vpn) dos testes diagnósticos.

O valor preditivo positivo responde a seguinte questão: dado que o exame resulta positivo, qual a probabilidade do animal realmente ter a doença?

O valor preditivo negativo responde a seguinte questão: dado que o exame resulta negativo, qual a probabilidade do animal não ter a doença?

Tabela 4.1 – Situações encontradas quando se pesquisa um teste diagnóstico para uma doença. Os animais podem ou não estar doentes e o resultado do teste diagnóstico pode ser positivo ou negativo. A partir destas quatro possibilidades (duas corretas e duas erradas), é possível calcular a sensibilidade, a especificidade, os valores preditivos positivo e negativo dos testes diagnósticos.

	Doente	São	Total
Exame +	Verdadeiro positivo A	Falso positivo b	Total de exames positivos a + b
Exame -	Falso negativo C	Verdadeiro negativo d	Total de exames negativos c + d
Total	Total de doentes a + c	Total de sãos b + d	Total de exames a + b + c + d

Para calcular a sensibilidade, se aplica o teste em um grupo de doentes e se compara os resultados com aqueles de um teste padrão denominado “padrão ouro”.

$$\text{Sensibilidade} = \frac{a}{a + c}$$

Para calcular a especificidade, se aplica o teste em um grupo de animais sãos (com o “padrão ouro” negativo) e se calcula a porcentagem de resultados negativos.

$$\text{Especificidade} = \frac{d}{b + d}$$

Calculo do valor preditivo positivo:

$$\text{Vpp} = \frac{\text{verdadeiros positivos } a}{\text{Total de exames positivos } a + b}$$

Calculo do valor preditivo negativo:

$$Vpn = \frac{\text{verdadeiros negativos } d}{\text{Total de exames negativos } c + d}$$

A análise estatística dos resultados do teste lacrimal de Schirmer foi realizada pelo teste de Fisher, considerando valores de $P < 0,05$ como significativos, utilizando o *software* Statview (SAS Institute Inc. Copyright® 1992-1998). A análise estatística dos resultados dos hemogramas foi realizada pelo teste T não pareado, utilizando o mesmo *software* ($P < 0,05$).

4.4 Resultados

Não foram observados resultados significativos para os valores obtidos com o Teste Lacrimal de Schirmer (ver Tabela 4.2).

Tabela 4.2 – Valores obtidos com o Teste Lacrimal de Schirmer realizado em cães, positivos e negativos para cinomose, testados com o imunoensaio cromatográfico.

Cães	Média	Desvio padrão
Negativos	4,46	6,18
Positivos	2,86	3,82
Valor de P	0,157*	

* valores significativos $P < 0,05$.

Os resultados dos hemogramas apresentaram significância ao teste T não pareado apenas para os valores dos leucócitos ($P<0,0001$), neutrófilos segmentados ($P<0,0001$), neutrófilos bastonetes ($P<0,0001$) e monócitos ($P=0,0032$) (ver Tabela 4.3).

Tabela 4.3 – Valores do hemograma de cães dos grupos positivos e negativos ao imunoensaio cromatográfico para o CDV, analisados estatisticamente pelo teste T não pareado.

	Grupos	Média	Desvio padrão	Valor de P*
eritrócitos	negativo	4,42	1,07	0,9083
	positivo	4,50	1,30	
hematócrito	negativo	28,20	8,34	0,7655
	positivo	29,38	7,76	
hemoglobina	negativo	9,60	2,93	0,846
	positivo	9,32	2,8	
VCM	negativo	63,04	4,08	0,3439
	positivo	66,06	6,64	
HCM	negativo	21,42	1,51	0,591
	positivo	20,71	2,76	
CHCM	negativo	33,96	0,61	0,0405
	positivo	31,36	2,62	
leucócitos	negativo	40400,00	20391,79	<0,0001
	positivo	13436,67	4957,92	
Neutrófilos bastonetes	negativo	7632,00	5279,08	<0,0001
	positivo	790,69	679,58	
Neutrófilos segmentados	negativo	28984,40	17762,41	<0,0001
	positivo	9648,40	3808,89	
linfócitos	negativo	2738,60	1819,42	0,657
	positivo	2401,73	1434,30	
monócitos	negativo	542,20	273,56	0,0032
	positivo	234,85	166,48	

* $P<0,05$ considerado estatisticamente significativo.

As porcentagens obtidas de cães positivos e negativos aos três testes realizados encontram-se na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Resultados dos testes de auxílio diagnóstico para a cinomose, realizados em cães de um abrigo de Curitiba – PR.

Resultado	Imunoensaio cromatográfico no líquor	Imunoensaio cromatográfico no soro	Soroneutralização
Positivo (%)	31 (67)	16 (52)	14 (45)
Negativo n (%)	15 (33)	15 (48)	17 (55)
Total de exames	46	31	31

Os testes de sensibilidade e especificidade foram calculados considerando a presença de corpúsculos de inclusão no exame histopatológico como “padrão ouro”. A partir destes resultados, foram calculados os valores preditivos positivos e negativos. Os valores calculados encontram-se na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Comparação dos valores obtidos nos testes de auxílio diagnóstico para a cinomose comparados ao exame histopatológico positivo para a presença de corpúsculos de inclusão (“padrão ouro”), realizados em cães de um abrigo de Curitiba – PR.

Padrão ouro x Teste	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Vpp (%)	Vpn (%)
Histopatológico x imunoensaio cromatográfico no líquor	86	100	100	67
Histopatológico x imunoensaio cromatográfico no soro	64	100	100	40
Histopatológico x soroneutralização	56	100	100	35

Vpp – valor preditivo positivo; Vpn – valor preditivo negativo.

O efeito citopático exercido pelo vírus da cinomose nos fibroblastos de embrião de galinha utilizados na soroneutralização é o achado que torna o teste positivo. Deve-se observar que este efeito citopático é quantificado até a última diluição em que é encontrado na leitura. Assim, é obtido o valor da diluição em que o vírus é capaz de realizar este efeito citopático. Como já citado, neste trabalho foi considerada positiva para cinomose a titulação maior ou igual a 1:16.

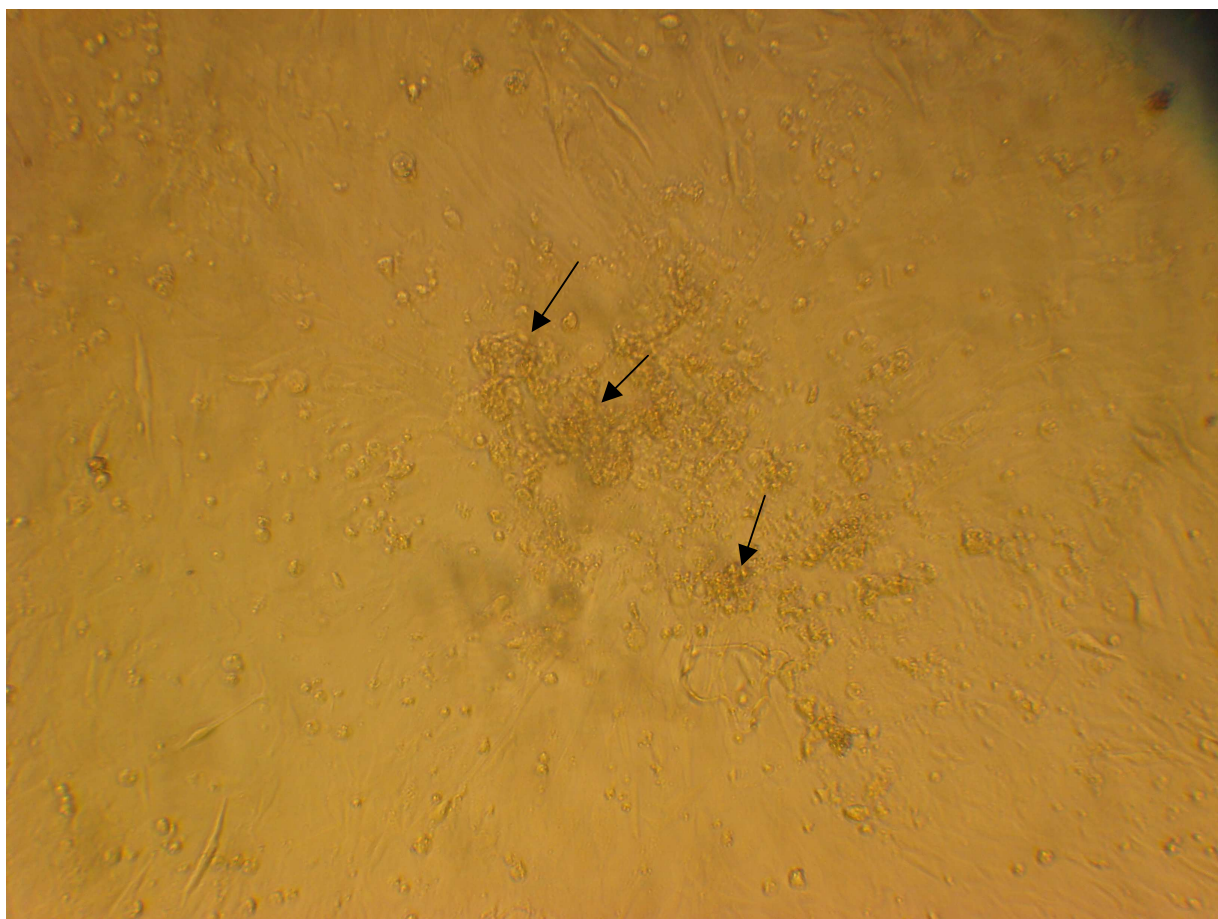


Figura 4.8 - Efeito citopático do vírus da cinomose em fibroblastos de embriões de galinha, após cinco dias de incubação, na técnica de soroneutralização. Note a vacuolização no citoplasma das células infectadas. Fonte: Laboratório Biovet.

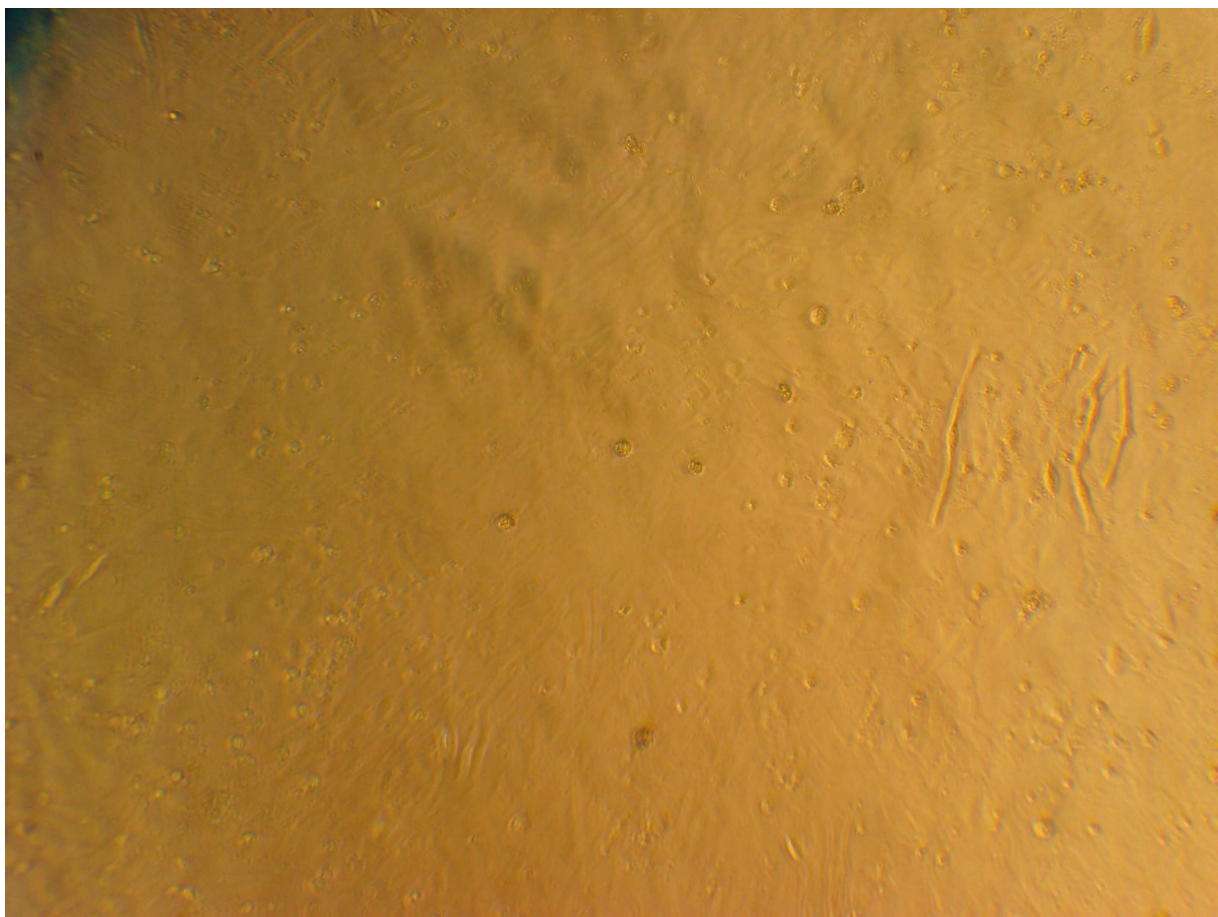


Figura 4.9 – Soroneutralização negativa para o vírus da cinomose, sem efeito citopático, após cinco dias de incubação. Fonte: Laboratório Biovet.

4.5 Discussão

Os valores do Teste Lacrimal de Schirmer não foram significativos para auxílio diagnóstico da cinomose porque os cães encontravam-se desidratados e a desidratação influencia o resultado deste teste. Segundo DiBartola (2007) a diminuição do volume no compartimento intersticial ocasiona menor umidade nas membranas mucosas, incluindo a conjuntiva, ocasionando o ressecamento. Este

ressecamento pode ser observado em cães com índices de desidratação entre 6 e 8%, mas sempre ocorre em índices entre 10 e 12% de desidratação.

O teste de imunoensaio cromatográfico apresenta, segundo Genelhu (2006), sensibilidade de 98,9% e especificidade de 97,7%. Solozobal et al (2004) testou o *kit* Anigen® para cinomose em sete cães suspeitos, coletando sangue e células epiteliais da conjuntiva de todos; se obtiveram seis testes positivos no sangue e na conjuntiva e um teste negativo em ambos os materiais biológicos. Outro experimento com o *kit* Anigen foi realizado no Instituto Hermes Pardini, por Foscolo (2004), onde foram testados cinco cães com sintomatologia para o VCC e cinco cães do grupo controle. Coletou-se raspado de células epiteliais e conjuntivais, os cinco cães suspeitos foram positivos e os cinco cães do grupo controle foram negativos.

Os valores encontrados no presente experimento corroboram com a indicação do fabricante do imunoensaio cromatográfico ser realizado no líquido, pois resultados próximos de sensibilidade (86%) e de especificidade (100%) do teste realizado no líquido foram obtidos em comparação com os apresentados na bula do *kit* comercial (sensibilidade 98,9% e especificidade 97,7%).

Os valores do hemograma analisados demonstraram diferença significativa apenas nas alterações encontradas nos leucócitos, especificamente nos neutrófilos segmentados, neutrófilos bastonetes e monócitos. Estes achados podem variar de leucopenia na fase aguda para leucocitose na fase crônica, já influenciada por infecções bacterianas secundárias. Segundo Beer (1999), a presença de desvios à esquerda associados a linfopenia são desfavoráveis ao prognóstico. Todavia as alterações nos linfócitos não foram significativas no presente experimento. Alterações semelhantes nos leucócitos, diferindo apenas nas alterações dos

linfócitos, foram também encontradas por Lopes-Júnior (2006). Sellon (2005) cita que a linfopenia pode estar ausente na cinomose.

Os anticorpos neutralizantes surgem entre 10 e 20 dias após a infecção pelo VCC (Appel, 1987). A soroneutralização realizada como diagnóstico nos animais do experimento justifica-se por serem cães abandonados no abrigo, provenientes da rua ou de proprietários com poucos recursos financeiros para a vacinação. Apesar do histórico de vacinação ser desconhecido provavelmente os cães não tinham sido vacinados, pois apresentavam os sinais típicos da cinomose.

No estudo de Monti et al (2007), foram testados os títulos para VCC por SN de quatro grupos de cães diante em diferentes situações de vacinação e um grupo sem vacinação. No grupo não vacinado, 90% dos cães não apresentaram título para o VCC, sugerindo que não entraram em contato com o vírus e que não estavam doentes. Apesar do estudo referenciado ter sido realizado em outro estado, sugere-se que cães só desenvolvem anticorpos quando entram em contato com o VCC, quando são vacinados ou quando desenvolvem infecção subclínica.

Os cães de rua parecem ser mais suscetíveis que cães domiciliados, já que geralmente apresentam títulos baixos de anticorpos contra o vírus, não recebem cuidados e apresentam maior chance de entrar em contato com partículas virais provenientes de outros cães já contaminados (Martins et al; Borba et al, 2002).

Segundo Hartmann et al (2007), nas cidades de Novo Hamburgo e Porto Alegre (RS), a maioria dos cães provenientes dos canis municipais, não teve contato prévio com o vírus, seja por infecção natural ou imunização prévia. Esta conclusão baseou-se em testes de soroneutralização, revelando baixos títulos nos animais dos

canis. Portanto, os títulos encontrados nos cães deste experimento podem indicar doença ativa, reforçando o uso da técnica de soroneutralização como uma forma de diagnóstico associada a outros exames complementares.

Segundo Castro e Heuschele (1992) um animal pode ter um prognóstico reservado se a titulação da soroneutralização for maior que 1:20 já no segundo ciclo virêmico. Títulos maiores que 1:100 significam que o animal está protegido. Já cães com o título entre 1:20 e 1:100 possuem prognóstico incerto, podendo desenvolver a forma crônica de encefalomielite causada pela cinomose. Três cães deste experimento apresentaram títulos acima de 1:100, mas estavam com sinais de doença ativa. Este fato contradiz a informação de que a titulação de 1:100 garante a proteção do animal. Talvez títulos maiores que 1:100 garantam a proteção dos animais que a obtiveram por meio de vacinação.

A soroneutralização demonstrou uma média sensibilidade (56%), mas uma ótima especificidade (100%) para ser utilizada como diagnóstico para a cinomose canina.

O imunoensaio cromatográfico realizado no soro pode resultar em falsos-negativos devido à neutralização do vírus pelos anticorpos circulantes. O teste também pode ser influenciado por alguns tipos de vacinas atenuadas, quando realizado 14 dias após a data da vacinação, mas não é influenciado por vacinas de vírus vivo modificado. De acordo com a discussão prévia, os cães do experimento muito provavelmente não foram vacinados, por se tratarem de cães de rua. O risco de utilizar o soro é desconhecer o histórico clínico do cão e não conseguir identificar em que fase da cinomose ele se encontra. Apesar destas observações, o teste ainda

obteve 64% de sensibilidade e 100% de especificidade, sendo superado apenas pelo imunoensaio cromatográfico realizado no líquido.

4.6 Conclusões

O uso de técnicas *ante mortem* que auxiliem o médico veterinário a diagnosticar a cinomose é essencial para o prognóstico do paciente, que depende de uma conduta terapêutica corretamente adotada. A comparação das técnicas em diferentes amostras permitiu a conclusão da necessidade de combinar diferentes técnicas para o diagnóstico, pois uma técnica pode ter resultados diferentes se testada com amostras diferentes, como líquido e sangue, provenientes de um mesmo animal. Igualmente, conhecer o histórico clínico do cão é muito importante para traçar a conduta diagnóstica a ser seguida pelo médico veterinário.

4.7 Referências

AMUDE, A.M.; CARVALHO, G.A.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Virus isolation and molecular characterization of canine distemper virus by RT-PCR from a mature dog with multifocal encephalomyelitis. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38, p. 354-356, 2007.

APPEL, M.J. Virus infections of carnivores. In:____. **Canine distemper virus**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1987. p. 133-159

APPEL, M.J.G; PEARCE-KELLING, S.; SUMMERS, B.A. Dog lymphocyte cultures facilitate the isolation and growth of virulent canine distemper virus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 4, n. 3, p. 258-263, 1992.

BLIXENKRONE-MØLLER, M.; PEDERSEN, I.R., APPEL, M.J., GRIOT, C. Detection of IgM antibodies against canine distemper virus in dog and mink sera employing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 3, n. 1, p. 3-9, 1991.

BORBA, T.R., MANNIGEL, R.C.; FRAPORTI, C.K.; HEADLEY, S.A.; SAITO, T.B. Cinomose: dados epidemiológicos Maringá-PR. **Cesumar**, v.4, n. 1, p. 53-56, 2002.

BRITO, F.L.C., SILVA JÚNIOR, V.A., MAIA, F.C.L., PEREIRA JÚNIOR, J.R., LAUS, J.L. Microalterações da glândula da terceira pálpebra em cães com cinomose e acometido por ceratoconjuntivite seca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 59, n.2, p. 340-344, 2007.

CASTRO, A.E.C.; WERNER, P. H. Veterinary diagnostic virology. In: POSTON, R.P.; ENGLAND, J.J. **Canine distemper**. Missouri: Mosby Year Book, Cap. 44, p.135-138.

FELDMAN, B.F., ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Scham's Veterinary Hematology**. 5 ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. 1344p.

FREITAS, T. R. P. **Conceitos básicos, métodos e técnicas em laboratório de virologia animal**. Minas Gerais: Tavares, 2006 176 p.

FOSCOLO, C.B. **Relatório referente ao teste do kit diagnóstico para a cinomose da empresa Bioeasy Diagnóstica LTDA**. Disponível em: www.bioeasy.com.br. Acesso em: 20/02/2008.

GEBARA, C.M.S., WOSIACKI, S.R., NEGRÃO F.J., ALFIERI A.A., ALFIERI A. F. Lesões histopatológicas no sistema nervoso central de cães com encefalite e diagnóstico molecular da infecção pelo vírus da cinomose canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 56, n. 2, p. 168-174, 2004.

GENELHU, M.S. **Anigen Rapid CDV Ag Test Kit**. Belo Horizonte, 2006. 1 bula de kit. Disponível: www.boieasy.com.br. Acesso: 15/01/2008.

GREENE, C.E; APPEL, M.J. **Canine distemper**. In: GREENE, C.E. **Infectious Diseases of The Dog and Cat**. 3.ed. Canada: Elsevier, 2006. cap. 3, p. 25-41.

HARTMANN, T.L.; BATISTA, H.B.C.R.; DEZEN, D.; SPILKI, F.R.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Anticorpos neutralizantes contra os vírus da cinomose e da parainfluenza e cães de canis dos municípios de Novo Hamburgo e Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**. v. 37, n. 4, p. 1178-1181, 2007

HEADLEY, S.A.; GRAÇA, D.L. Canine distemper: epidemiological findings of 250 cases. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v. 37, n. 2, 2000.

HOSKINS, J. D. **Pediatria veterinária: cães e gatos do nascimento aos seis meses**. 2 ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1997. 601 p.

KUBO, T., KAGAWA, Y., TANIYAMA, H., HASEGAWA, A. Distribution of Inclusion Bodies in Tissues from 100 Dogs Infected with Canine Distemper Virus. **The Journal of Veterinary Medical Science**. v. 69, n. 5, p. 527-29, 2007.

LOPES-JÚNIOR, C. G. **Avaliação do perfil hematológico, bioquímico e eletroforese das proteínas séricas de cães com cinomose atendidos no hospital veterinário d Universidade Federal Rural de Pernambuco**. 2006. Recife, 45f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Curso de Pós Graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco

MARTELLA, V.; ELIA, G.; BUONAVOGIA, C. Canine distemper virus. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**. v. 38, p. 787-797, 2008.

MARTINS, D. B.; LOPES, S. T. A; FRANÇA, R. T. Cinomose canina – Revisão de literatura. **Acta Veterinaria Brasilica**. v. 3, n. 2, p 68-76, 2009.

MATHEWS, K.A. **Monitoração e complicações da fluidoterapia**. In: DIBARTOLA, S.P. Anormalidades de fluídos, eletrólitos e equilíbrio ácido-básico na clínica de pequenos animais. 3 ed. São Paulo: Roca, 2007. p. 362-376.

MENDONÇA, C.S. **Alterações anatomohistopatológicas no coração de cães com cinomose**. 2004. Uberlândia. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia.

MONTI, F.S; VIANA, J.A.; BEVILACQUA, P.D.; MORAES, M.P.; SALCEDO, J.H.P. Anticorpos contra o vírus da cinomose de cães vacinados em diferentes estabelecimentos. **Revista Ceres**. v. 54, p. 14-19, 2007.

NELSON, R.W.; COUTO, C.E. **Medicina interna de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 1084.

ORGANIZACION DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION. **Manual de técnicas de diagnóstico virológico**. Argentina, 1983. p. 2-5.

SCHERDING, R.G. **Cinomose canina**. In: BIRCHARD, S.J. & SCHERDING, R.G. Manual Saunders: Clínica de Pequenos Animais. 2. ed. São Paulo: Roca, 2003. p.117-120.

SELLON, R.K. **Canine viral diseases**. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E.C. Diseases of the dog and the cat. Missouri: Elsevier, 2005. 6 ed., v. 1, p. 649-650.

SILVA, I.N.G, GUEDES, M.I.F.; ROCHA, M.F.G.; MEDEIROS, C.M.O.; OLIVEIRA, L.C.; MOREIRA, O.C.; TEIXEIRA, M.F.S. Perfil hematológico e avaliação eletroforética das proteínas séricas de cães com cinomose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 57, n. 1, p. 136-139, 2005.

SOLOZABAL, J.M.R., GOMES, T.C., ACCETTA, E.M.T., ACCETA, J.L., FERREIRA, J.C.A., AZEVEDO, R.A.S., SILVA, C.B. Utilização do kit comercial Anigen no diagnóstico da cinomose. **MAAXLAB**, v. 1, p. 70-71, 2007.

VON MESSLING, V.; HARDER, T.C.; MOENNIG, V.; RAUTENBERG, P.; NOLTE, I.; HAAS, L. Rapid and sensitive detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies against canine distemper virus by a new recombinant nucleocapsid protein-based enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 37, n. 4, p. 1049-1056, 1999.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A origem dos cães deste experimento explica a grande ocorrência da cinomose, pois abrigos são locais comumente infectados pelo VCC.

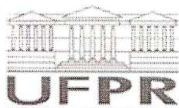
Baseada nos resultados do presente trabalho, em que os cães apresentaram CCS secundária à replicação viral do VCC, que é acompanhada pela presença de conjuntivite viral, sugere-se estudos com medicamentos específicos para este tipo de conjuntivite.

Os achados de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos e intranucleares nos exames histopatológicos foram importantes para o diagnóstico da cinomose canina, confirmando ser este exame *post mortem* um dos mais sensíveis métodos para confirmar a infecção por VCC. Principalmente, a conclusão de que as amostras da glândula da terceira pálpebra superaram as amostras de bexiga para encontrar os corpúsculos de inclusão do VCC no exame histopatológico.

A utilização do líquido para realizar o imunoensaio cromatográfico comprovou estatisticamente ser a escolha correta para a triagem dos animais incluídos no presente experimento.

A utilização da combinação de técnicas, baseadas no histórico do cão, associadas ao exame clínico e aos sinais apresentados, demonstraram ser a fórmula para o diagnóstico *ante mortem* e para uma conduta terapêutica adequada ao cão com cinomose.

6. ANEXO



Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo no. 034/2008, referente ao projeto “Investigação descritiva dos achados clínicos e histopatológicos do bulbo ocular e anexos em cães infectados pelo vírus da cinomose”, sob a responsabilidade de Flávia Bianca Pereira, na forma em que foi apresentado, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 13 de outubro de 2008. Este certificado expira em 13 de outubro de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 034/2008, regarding the project “Descriptive investigation of clinical and histopathological findings of the ocular bulb and annexes in dogs infected by the canine distemper virus”, in charge of Flávia Bianca Pereira, in the terms it was presented, was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Parana, Southern Brazil) during session on October 13, 2008. This certificate expires on October, 2009.

Curitiba, 13 de outubro de 2008.



Rogério Ribas Lange
Presidente



Fabiano Montiani Ferreira
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais
Setor de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Paraná.

7 VITA

Técnica em Patologia Clínica, formada no Colégio Estadual do Paraná (1997).

Médica Veterinária graduada pela Universidade Tuiuti do Paraná (2004).

Prêmios pela conclusão do curso de Medicina Veterinária em primeiro lugar:

- Honra ao mérito, Conselho Regional de Medicina Veterinária (2004);
- Dr. Marcos Augusto Enrietti, Academia Paranaense de Medicina Veterinária (2004);
- Sydney Lima Santos, Universidade Tuiuti do Paraná (2004)

Veterinária contratada da Sociedade Protetora dos Animais de Curitiba (desde 2005).

Extensão Universitária em Oftalmologia Veterinária na Universidade Federal do Paraná (2007).

Veterinária do Quadro Próprio do Magistério do Estado do Paraná, área de Pecuária (desde 2009).

Palestrante no 4º Seminário de Sustentabilidade da FAE Centro Universitário (2009).

Artigo publicado nos Anais do 4º Seminário de Sustentabilidade da FAE Centro Universitário – “Comparação de fauna e flora em ambientes nativos e antropizados” (2009).

Bióloga graduada pela Faculdade de Tecnologia e Ciências (2010).

Mestre em Ciências Veterinárias na Universidade Federal do Paraná, linha de pesquisa em Clínica, Cirurgia e Patologia Veterinária, área de Oftalmologia Veterinária (2010).